INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

Vorgelegt von Diplom-Biologen Frank Gesellchen aus: Merzig

Tag der mündlichen Prüfung:

Rekombinante Expression und vergleichende biochemische Charakterisierung der Isoformen Cβ1 und Cβ2 der katalytischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase

Gutachter:

Priv. Doz. Dr. Dieter Kübler Priv. Doz. Dr. Gabriele Petersen

Danksagung:

Herrn Dr. Dirk Bossemeyer danke ich für die Betreuung dieser Arbeit, seine stetige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung und die vielen neuen Ideen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Kinzel danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Abteilung für Pathochemie am DKFZ Heidelberg durchzuführen, für viele interessante Diskussionen und Anregungen.

Bedanken möchte ich mich ebenso bei Herrn PD Dr. Kübler, für seine Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten und vor der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Heidelberg zu vertreten, sowie für seine unschätzbare Hilfe in administrativen Fragen.

Ein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Angel Alonso und Jürgen Fischer, die mir bei der Etablierung des Baculovirus-Expressionssystems mit Rat und Tat zur Seite standen.

Herrn James Richards gilt mein Dank für seine Unterstützung bei den Zellkulturarbeiten, Herrn Norbert König (von Speyer) möchte ich für seine Hilfe im Labor und seinen Einsatz als Netzwerkadministrator danken.

Ein herzlicher Dank geht an Dr. Anna-Lisa Picciolo-Lehrke, Dr. Thorsten Schneider, Dr. Andreas Tholey und Dr. Manuela Klingler-Hoffmann, für die kollegiale Zusammenarbeit und gegenseitige moralische Unterstützung.

Herrn Dr. Andreas Schlosser danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Friedrich "Fritz" Herberg, für die Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der SPR-Messungen an der Ruhr-Universität Bochum.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Familie, auf deren Unterstützung ich während Studium und Promotion immer zählen konnte.

Inhaltsverzeichnis:

1	EINLI	EITUNG	.1					
1.1	Die re	VERSIBLE PROTEINPHOSPHORYLIERUNG	. 1					
1.2	PROTE	INKINASEN	. 2					
1.3	DIE CA	MP-ABHÄNGIGE PROTEINKINASE	.4					
1	3.1 Die re	egulatorischen Untereinheiten der PKA	. 5					
1	3.2 Die k	atalytischen Untereinheiten der PKA	. 7					
	1.3.2.1	Isoformen der C-Untereinheiten	. 7					
	1.3.2.2	Struktur der Cα-Untereinheit	. 8					
	1.3.2.3	Posttranslationale Modifikationen	.9					
1	3.3 Die k	atalytischen Untereinheiten C β 1 und C β 2	10					
1.4	Zielse	TZUNG DER ARBEIT	12					
2	MATH	ERIAL UND METHODEN	14					
2.1	Mater	RIALIEN	14					
2	1.1 Mater	rialien für die Molekularbiologie	14					
	2.1.1.1	Medien und Nährböden zur Bakterienanzucht	14					
	2.1.1.2	Bakterienstämme	15					
	2.1.1.3	Enzyme	15					
	2.1.1.4	Vektoren und Plasmide	15					
	2.1.1.5	Kits	16					
	2.1.1.6	Oligonukleotide	16					
2	1.2 Mater	rialien und Geräte für die Zellkultur	17					
2	1.3 Chem	ikalien	17					
2	1.4 Pepti	de	18					
2	1.5 Vorge	efertigte Materialien	18					
2	1.6 Labor	rgeräte	19					
2.2	Mole	KULARBIOLOGISCHE METHODEN	20					
2.2	2.1 Restri	iktionsverdau von DNA	20					
2.2	2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese							
2.2	2.3 Elutic	on von DNA aus Agarosegelen	21					
2.2	2.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten							

2.2.5 Herst	tellung kompetenter Bakterien	22
2.2.6 Tran	sformation kompetenter Bakterien	
2.2.7 Plasm	nid-Präparation	23
2.2.7.1	Mini-Präparation (Triton-Koch Methode)	
2.2.7.2	Plasmid Präparation mit dem Qiagen Plasmid Midi-Prep Kit	
2.2.7.3	Plasmid Präparation mit dem Invitrogen S.N.A.P. Midi Präp Kit	
2.2.8 Bacu	lovirus-DNA Präparation	
2.2.9 Fälle	n von DNA	
2.2.10 Spel	ktrophotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	
2.2.11 Poly	vmerase Kettenreaktion (PCR)	
2.2.12 Reir	nigung von PCR-Produkten mit dem QIAquick PCR-Purification Kit	
2.2.13 Orts	sspezifische Mutagenese von Plasmid-DNA	
2.2.14 DN	4-Sequenzierung	
2.2.15 Klor	nierungen	31
2.2.15.1	Klonierung von Cβ2 in pASK-IBA 6	
2.2.15.2	Klonierung von Cβ2 in pASK-IBA 7	
2.2.15.3	Klonierung von Cβ2 in pBlueBac4.5	
2.2.15.4	Klonierung von Cβ1 in pET28b(+)	
2.3 Zellk	ULTUR	
2.3.1 Adhä	rente Sf9-Kultur:	
2.3.2 Sf9-S	uspensionskultur:	
2.3.3 Einfr	ieren der Zellen	35
2.4 Rekon	MBINANTE EXPRESSION VON PROTEINEN	
2.4.1 Bakte	erielle Expression mit dem pET-System	35
2.4.2 Bakte	erielle Expression mit dem Strep-tag System	
2.4.3 Reko	mbinante Expression in Sf9-Insektenzellen mit dem Baculovirus	
Expr	ressionssystem	37
2.4.3.1	Transfektion von Sf9 Zellen mit kationischen Liposomen	
2.4.3.2	Plaque-Assay	39
2.4.3.3	Amplifikation rekombinanter Viren	40
2.4.3.4	Optimierung der Expression	42
2.4.3.5	Rekombinante Expression im großen Maßstab	42
2.5 Вюсн	EMISCHE METHODEN	43
2.5.1 Gewi	nnung von Zellextrakten	43

	2.5.1.1	Lyse von Bakterienzellen	
	2.5.1.2	Lyse von Sf9-Zellen	
	2.5.1.3	Lyse von CHO-Zellen	
	2.5.1.4	Herstellung von Rohextrakt aus Rinderherzgewebe	
	2.5.2 Prote	inmengenbestimmung nach der Methode von Bradford	44
	2.5.3 SDS-	Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	
	2.5.4 Coon	assie-Blau Färbung	
	2.5.5 Weste	ern Blotting	
	2.5.5.1	Transfer von Proteinen auf PVDF-Membran	
	2.5.5.2	Proteinfärbung auf PVDF-Membranen	47
	2.5.5.3	Antikörpernachweis (Immundetektion)	47
	2.5.6 Gewi	nnung von Peptidantiseren	48
	2.5.6.1	Peptidsynthese	
	2.5.6.2	Immunisierung	
	2.5.6.3	Affinitätsreinigung der Antikörper	
	2.5.7 Kopp	lung von Peptiden an Affi-Gel 10/15	49
	2.5.8 PKI(5-24) Affinitätschromatographie	50
	2.5.9 Strep	Tactin-Affinitätschromatographie	51
	2.5.10 Prot	teinkinase-Assays	52
	2.5.11 Inter	raktionsmessungen mit Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR)	53
	2.5.11.1	SPR-Messungen mit C- und R-Untereinheiten	
	2.5.11.2	SPR-Messungen mit C-Untereinheiten und GST-PKI	55
3	ERGE	CBNISSE	56
3	.1 GEWIN	INUNG ISOFORM-SPEZIFISCHER ANTISEREN	
	3.1.1 Char	akterisierung der Peptidantiseren	56
3	.2 UNTER	SUCHUNGEN AN RINDERHERZGEWEBE	59
3	.3 Unter	SUCHUNGEN IN CHO-ZELLLYSATEN	60
3	.4 Rekon	μβιναντε Expression von Cβ2	
	3.4.1 Expre	ession von C β 2 mit dem pET-System	63
	3.4.1.1	Expression von Cβ2-Mutanten	65
	3.4.2 Expre	ession von Cβ2 mit dem Strep-tag II Expressionssystem	66
	3.4.2.1	Expression mit dem Vektor pASK-IBA6	
	3.4.2.2	Expression mit dem Vektor pASK-IBA7	
	3.4.3 Expre	ession mit rekombinanten Baculoviren	
	-		

3.4.3.1	Erzeugung rekombinanter Baculoviren	71
3.4.3.2	2 Isolierung und Identifizierung rekombinanter Baculoviren	
3.4.3.3	Nachweis von Kinaseaktivität im Lysat infizierter Sf9 Zellen	74
3.4.3.4	Rekombinantes C β 2-Protein aus Sf9-Zellen bindet an PKI(5-24) Pe	eptid 75
3.4.3.5	5 Mit rekombinanten Baculoviren infizierte Sf9-Zellen weisen eine v	/eränderte
	Morphologie auf	77
3.4.3.6	6 Optimierung der Expression von Cβ2 in Sf9-Zellen	
3.4.4 PK	$I(5-24)$ -Affinitätsreinigung von rekombinant exprimiertem C β 2	
3.4.5 Sta	bilität und Lagerung des Cβ2-Proteins	
3.4.6 Ide	ntifizierung des affinitätsgereinigten Proteins über ESI-MS	
3.5 Rek	OMBINANTE EXPRESSION VON Cβ1	
3.5.1 Exp	pression von Cβ1 mit dem pET-Expressionssystem	
3.5.2 PK	$I(5-24)$ Affinitätsreinigung von C β I	
3.5.3 Sta	bilität und Lagerung des Cβ1 Proteins	
3.5.4 Ma	ussenspektrometrische Untersuchungen des $C\beta$ l Proteins	
3.6 VER	GLEICHENDE BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DER REKOMBINANTE	ν Cβ-
Unt	EREINHEITEN	
3.6.1 Mic	chaelis-Menten Kinetik mit Kemptid und ATP als Substrat	
3.6.2 Inh	ibition der Phosphotransferaseaktivität durch PKI(5-24) Peptid	
3.6.3 Inh	ibition der Phosphotransferaseaktivität durch die regulatorische Unter	reinheit
RL	Ια	
3.6.4 Inte	eraktionsmessungen zwischen R- und C-Untereinheiten mittels	
Ob	berflächenplasmonresonanz (SPR)	
3.6.5 Inte	eraktion zwischen GST-PKI und den C-Untereinheiten	
3.7 UNT	ERSUCHUNGEN ZUR SUBSTRATSPEZIFITÄT DER C-UNTEREINHEITEN	
3.7.1 Pho	osphorylierung bekannter PKA-Substrate durch Cβ1 und Cβ2	
3.7.2 His	stonIIAS inhibiert die Phosphorylierung von ANP und MBP durch $C\beta$	l und C _B 2
3.7.3 Die	e inhibitorische Aktivität von Histon IIAS auf die Cβ-Untereinheiten ze	igt
Ch	narakteristika eines Proteins	
3.7.4 His	ston H3 ist für die C eta -Untereinheiten ein schlechteres Substrat als für (Сα 106
3.7.5 His	ston H3 inhibiert nicht die Phosphorylierung des ANP durch die C eta -	
Un	ntereinheiten	

4		DISKUSSION10)9
4	.1	ISOFORMSPEZIFISCHE ANTIKÖRPER GEGEN DIE C-UNTEREINHEITEN ALS WICHTIGES	
		WERKZEUG FÜR IMMUNBIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN	0
4	.2	Rekombinante Expression der C β -Untereinheiten	13
	4.2	2.1 Expression von $C\beta$ in E. coli	13
	4.2	2.2 Expression von $C\beta^2$ in E. coli	17
	4.2	2.3 Expression von C β 2 in Sf9-Insektenzellen 1	19
4	.3	Vergleichende biochemische Charakterisierung der C β -Untereinheiten 12	23
	4.3	B.1 Cα, Cβ1 und Cβ2 unterscheiden sich in ihren kinetischen Konstanten	23
	4.3	B.2 Cβ1 und Cβ2 zeigen keine Unterschiede in der Inhibition durch PKI(5-24) und	
		RIIα12	24
	4.3	3.3 Interaktionsmessungen mit Oberflächenplasmonresonanz zeigen eine höhere	
		Affinität der C β -Untereinheiten zu RI α und RII α	25
4	.4	C $\beta 1$ und C $\beta 2$ zeigen Unterschiede zu C α in der Phosphorylierung einzelne	R
		SUBSTRATE DER <i>PKA</i>	27
	4.4	4.1 Die Histon IIAS-Präparation enthält einen C β -spezifischen Inhibitor mit	
		Proteincharakter 12	28
	4.4	2.2 H3 zeigt als einziges Histon deutliche Unterschiede in der Phosphorylierung durc	h
		die C-Untereinheiten12	30
	4.4	4.3 Die inhibitorische Aktivität in Histon IIAS-Präparationen ist auf ein noch	
		unbekanntes Protein zurückzuführen 12	30
4	.5	Möglicher Einfluss von Sequenzunterschieden zwischen $C\alpha$ und $C\beta1$ auf	
		PROTEIN-PROTEIN INTERAKTIONEN	32
5		ZUSAMMENFASSUNG13	37
6		LITERATURVERZEICHNIS	38
7		ANHANG	52
7.	1	PLASMIDKARTEN	52
7	.2	SEQUENZVERGLEICH ZWISCHEN C α , C β 1 und C β 215	53
7	.3	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:	54

1 Einleitung

1.1 Die reversible Proteinphosphorylierung

Im Jahre 1992 wurde der Nobelpreis für Medizin an die amerikanischen Forscher Edmond H. Fischer und Edwin G. Krebs verliehen, "for their discoveries concerning reversible protein phosphorylation as a biological regulatory mechanism". Mit dieser Ehrung wurden Entdeckungen gewürdigt, die Fischer und Krebs bereits in den 50er Jahren, bei der Untersuchung des Glykogenstoffwechsels in der Leber machten. Dabei zeigte sich, dass das Enzym Phosphorylase, welches den Abbau von Glykogen zu Glukose katalysiert, aus seiner inaktiven Form (Phosphorylase b) in die aktive Form (Phosphorylase a) überführt wird, indem von der Verbindung ATP, die ein hohes Gruppenübertragungspotential hat, ein Phosphatrest auf die Phosphorylase übertragen wird. Das Enzym, das diese Phosphatübertragung katalysiert, ist eine Proteinkinase, sie wurde nach ihrem Substrat als Phosphorylasekinase bezeichnet (Krebs and Fischer, 1959). Diese Aktivierung kann durch Dephosphorylierung - katalysiert durch eine Proteinphosphatase - rückgängig gemacht und die Phosphorylase damit wieder in ihre inaktive Form überführt werden. Es sollte sich herausstellen, dass die reversible Proteinphosphorylierung (siehe Abb.1) ein fundamentaler biologischer Regulationsmechanismus ist, der es einer Zelle erlaubt, schnell und effizient auf externe oder interne Stimuli zu reagieren.



Abbildung 1: Schematische Darstellung des Mechanismus der reversiblen Proteinphosphorylierung

Bei der Phosphorylierung wird ein Phosphatrest unter katalytischer Vermittlung einer Proteinkinase von einem Nukleosidtriphosphat (NTP) auf ein Protein übertragen. Dieses Phosphoprotein (Protein-(P)) kann dann durch eine Protein-Phosphatase unter Abspaltung eines ionischen Phosphates (P_i) wieder in den Ausgangszustand überführt werden. NDP=Nukleosiddiphosphat

Das Beispiel der Phosphorylasekinase ist nur eines von vielen, bei denen die Aktivität eines Proteins durch Phosphorylierung reguliert wird. Man nimmt an, dass etwa 30% aller Proteine in einer Zelle als Phosphoproteine vorliegen (Davies et al., 2000). Damit ist die reversible Proteinphosphorylierung die bislang häufigste posttranslationale Modifikation von Proteinen. Dabei ist die Rolle der Phosphorylierung nicht auf die Aktivierung von Enzymen beschränkt, sie kann auch inaktivierend wirken, Proteininteraktionen vermitteln oder Proteinkomplexe dissoziieren, oder auch die Löslichkeit von Proteinen beeinflussen.

1.2 Proteinkinasen

Bei den Proteinkinasen handelt es sich um eine der größten Proteinfamilien in Eukaryoten. Nach Abschluss des Humangenomprojekts (Lander et al, 2001) wird die Zahl der Proteinkinasen, die im menschlichen Genom codiert sind, mit insgesamt 518 angegeben (Manning et al., 2002). Es dauerte jedoch etwa zehn Jahre bis nach der Phosphorylasekinase erneut ein Mitglied dieser Proteinfamilie gereinigt und charakterisiert wurde: die cAMPabhängige Proteinkinase (cAPK) oder auch Proteinkinase A (PKA) (Walsh et al, 1968), welche u.a. die Phosphorylasekinase phosphoryliert und damit aktiviert. Erst als man die zentrale Bedeutung der Proteinkinasen für die Steuerung zellulärer Prozesse erkannte und besonders mit der Entwicklung molekularbiologischer Methoden in den achtziger Jahren stieg die Zahl der bekannten Proteinkinasen rapide an (Hunter, 1994; Manning et al., 2002). Die Vielzahl der heute bekannten Proteinkinasen machte eine Klassifizierung notwendig. Eine grobe Unterteilung erfolgt dabei auf der Basis der Akzeptoraminosäure, auf welche die y-Phosphatgruppe des Co-Substrates (ATP oder GTP) unter Bildung eines Phosphatesters übertragen wird. So unterscheidet man zwischen Serin/Threonin und Tyrosinkinasen (Krebs and Beavo, 1979, Hunter, 1991). Es gibt auch eine kleine Gruppe von Kinasen, die eine Dualspezifität aufweisen und sowohl Seryl-/Threonyl- als auch Tyrosylreste phosphorylieren können (Lindberg et al., 1992).

Die Serin/Threonin spezifischen Kinasen werden aufgrund funktioneller und struktureller Eigenschaften in verschiedene Untergruppen unterteilt. Dazu gehören unter anderem die von zyklischen Nukleotiden abhängigen Kinasen (cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinase), phospholipidabhängige Proteinkinasen (Proteinkinase C), Ca²⁺/Calmodulin regulierte Kinasen (CaM-Kinase), cyclin-abhängige Kinasen (cdk), und mitogenaktivierte Kinasen (MAP-Kinasen).

Bei den Tyrosinkinasen unterscheidet man zwischen den Rezeptortyrosinkinasen und den cytoplasmatischen Tyrosinkinasen; auch hier werden beide Gruppen wieder in mehrere Subfamilien unterteilt. Die Rezeptortyrosinkinasen stehen oft am Beginn der Signalübermittlung in der Zelle, indem sie einen externen Stimulus (die Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Rezeptordomäne) in ein internes Signal (Phosphorylierung eines Substrates) umwandeln. Dieses Signal wird dann häufig über Ser-/Thr-Kinasen weitergeleitet und dabei verstärkt.

Allen Kinasen gemeinsam ist ihre domänenartige Struktur, wobei das katalytische Zentrum bei allen bekannten Proteinkinasen hochkonserviert ist (Hanks et al. 1988). Der zwischen 250 und 300 Aminosäuren umfassende katalytische Kern ist für die Bindung von Kosubstrat (ATP oder GTP) und Substrat verantwortlich und katalysiert die Phosphorylierungsreaktion. Gemeinsamkeiten sind auch in den Aktivierungsmechanismen vorhanden, die sich auf strukturelle Übereinstimmungen in der katalytischen Region zurückführen lassen. Von Bedeutung sind dabei insbesondere der Glycin-reiche Loop, die C-Helix, die ATP-Bindungstasche und das Aktivierungssegment. (Engh and Bossemeyer, 2001, vgl. Abbildung 2). Große Unterschiede gibt es dagegen in der Substratspezifität, der Gewebespezifität und der intrazellulären Verteilung. Für diese Diversität sind bestimmte Bereiche der katalytischen Domänen, aber insbesondere auch die nichtkonservierten Domänen verantwortlich, die sich N- und C-terminal an den katalytischen Kern anschließen. Diese Domänen spielen auch eine wichtige Rolle bei der Regulation von Proteinkinasen. Die Vielzahl von möglichen Proteinkinasesubstraten und die Tatsache, dass Phosphorylierungen häufig in Form von Kaskaden ablaufen, um eine Verstärkung des Signals zu erreichen, machen die Notwendigkeit einer strikten Regulation deutlich. Eine Deregulation von Proteinkinasen hat häufig unkontrolliertes Zellwachstum zur Folge (Bishop, 1987; Pawson and Hunter, 1994).

Die Regulation erfolgt dabei auf räumlicher und zeitlicher Ebene. In einer unstimulierten Zelle liegen die meisten Proteinkinasen im inaktiven Zustand vor. Dies kann entweder durch intermolekulare Wechselwirkungen mit regulatorischen Untereinheiten oder aber intramolekular durch autoinhibitorische Mechanismen gewährleistet werden. Für die Aktivierung von Proteinkinasen gibt es unterschiedliche Mechanismen. Dies kann beispielsweise die Phosphorylierung oder Dephosphorylierung eines kritischen Aminosäurerestes im Aktivierungssegment oder die Bindung eines sekundären Botenstoffes (*second messenger*) wie cAMP, Ca²⁺ oder Diacylglycerol sein. In jedem Fall wird dadurch eine Konformationsänderung des Enzyms zu seiner katalytisch aktiven Form induziert, in

3

welcher das aktive Zentrum für Substrate zugänglich wird (Johnson et al, 1996; Engh and Bossemeyer, 2001).

Ebenfalls von Bedeutung für die Aktivität ist die gewebe- und zellzyklusabhängige Expression einer Kinase sowie ihre intrazelluläre Lokalisation. Durch Interaktion mit Cytoskelettelementen und spezifischen Ankerproteinen unterliegen viele Proteinkinasen einer Kompartimentierung, die ihrerseits wieder aufgrund äußerer Signale verändert werden kann und so beispielsweise den Zugang zu Substraten an der Zellmembran oder im Zellkern erlauben oder verhindern kann (Mochly-Rosen, 1995, Faux and Scott, 1996).

Für die Substraterkennung sind neben dem zu phosphorylierenden Aminosäurerest auch Reste in der unmittelbaren Umgebung von Bedeutung. So phosphoryliert beispielsweise die cAMPabhängige Proteinkinase bevorzugt Serin- oder Threoninreste in der Sequenz Arg – Lys/Arg-X- Ser/Thr (X bezeichnet eine beliebige Aminosäure), während für die Substraterkennung bei Caseinkinasen (CKs) negativ geladene Reste entweder N- (CK I) oder C-terminal (CK II) von der Phosphoakzeptoraminosäure essentiell sind (Kennelly and Krebs, 1991).

1.3 Die cAMP-abhängige Proteinkinase

Die cAMP-abhängige Proteinkinase ist das wohl am besten untersuchte Protein dieser Enzymklasse und dient seit geraumer Zeit als Modellsystem für die gesamte Proteinfamilie. Sie kommt in allen bisher daraufhin untersuchten Geweben vor und ihre Isoformen sind von der Hefe bis zu den Säugetieren in allen tierischen Organismen vertreten, was ihre zentrale Bedeutung bei der zellulären Signalvermittlung unterstreicht.

Die PKA gilt als Hauptsensor der Zelle für Änderungen im cAMP-Spiegel. Zyklisches AMP (cAMP) wurde als einer der ersten sekundären Botenstoffe beschrieben (Sutherland and Rall, 1957). Zyklisches AMP wird aus ATP von dem Enzym Adenylylcyclase synthetisiert, dessen Aktivität von G-Protein gekoppelten Rezeptoren als Antwort auf die Bindung von Hormonen an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors moduliert wird (Sutherland, 1971, Iyengar, 1993). Der Abbau von cAMP erfolgt hydrolytisch durch Phosphodiesterasen (PDE), was eine dauerhafte Aktivierung der PKA verhindert (Rybalkin and Beavo, 1996). Interessanterweise werden sowohl einige Phosphodiesterasen (PDE3B, PDE4D3), als auch G-Protein gekoppelte Rezeptoren (z.B. der β 2-adrenerge Rezeptor) von der PKA selbst durch Phosphorylierung in ihrer Aktivität reguliert, wodurch es zu einer negativen Rückkopplung kommt (Rahn et al. 1996, Sette and Conti, 1996, Daaka et al, 1997).

Das PKA-Holoenzym ist ein inaktives Tetramer aus zwei dimerisierten regulatorischen (R) und zwei monomeren katalytischen (C) Untereinheiten (R_2C_2). Die Aktivierung erfolgt durch die Bindung von je zwei Molekülen cAMP an die regulatorischen Untereinheiten. Dies führt zu einer Konformationsänderung der R-Untereinheiten, durch die ihre Affinität für die C-Untereinheiten um 4-5 Größenordnungen gesenkt wird (Granot et al., 1980), so dass diese gemäß der Gleichung

 $\begin{array}{c} R_2C_2 + 4 \text{ cAMP} \longrightarrow R_2(\text{cAMP})_4 + 2 \text{ C} \\ \text{(inaktiv)} & (aktiv) \end{array}$

dissoziieren, wobei die R-Untereinheiten als Dimer verbleiben. Die freien C-Untereinheiten sind katalytisch aktiv und können Substrate im Cytoplasma oder im Zellkern phosphorylieren. Für die PKA ist eine Vielzahl von Substraten bekannt (z. Zt. über 100 physiologische Substrate) und ständig kommen neue hinzu (für eine Zusammenfassung siehe Shabb, 2001). Entsprechend vielfältig ist auch die Zahl an zellulären Prozessen, bei denen die PKA eine Schlüsselrolle spielt. Dazu zählen unter anderem Zellwachstum und Differenzierung, Signalübertragung, Zellstoffwechsel, Apoptose und die Gedächtnisbildung (Krebs and Beavo, 1979; Cho-Chung et al., 1995; Tasken et al., 1997; Weissinger et al., 1997; Qi et al., 1996). Neben den kurzfristigen Effekten, die durch die Phosphorylierung hervorgerufen werden, werden also auch Langzeiteffekte durch die Aktivität der PKA vermittelt.

1.3.1 Die regulatorischen Untereinheiten der PKA

Sowohl bei den katalytischen, als auch bei den regulatorischen Untereinheiten sind mehrere Isoformen beschrieben worden. Bei den regulatorischen Untereinheiten sind dies die Isoformen RI α und RI β (Typ I; Lee et al., 1983, Clegg et al., 1988), RII α und RII β (Typ II, Jahnsen et al. 1986, Scott et al., 1987). Während die α -Isoformen der R-Untereinheiten in fast allen Geweben konstitutiv exprimiert werden, scheinen die β -Isoformen mit stärkerer Gewebespezifität exprimiert zu werden (McKnight et al., 1988, Cadd and McKnight, 1989). Alle R-Untereinheiten binden katalytische Untereinheiten bereits bei subnanomolaren Konzentrationen, wobei die R-Untereinheiten über N-terminale Domänen dimerisiert vorliegen. In den dabei gebildeten Holoenzymen konnten bislang nur R-Untereinheiten eines Typs (entweder I oder II) nachgewiesen werden, Heterodimere aus den α – und β -Untereinheiten der RI-Untereinheiten wurden jedoch gefunden (Tasken et al., 1993). ihre Sensitivität gegenüber cAMP, da die RIβ-Untereinheit im Holoenzym bereits bei geringeren cAMP-Konzentrationen aktiviert wird als die übrigen Untereinheiten (Cadd et al., 1990).

RI- und RII-Untereinheiten unterscheiden sich in ihrer subzellulären Lokalisation. Während die RI-Untereinheiten hauptsächlich im Cytoplasma vorkommen, werden die RII-Untereinheiten über die Interaktion mit A-Kinase Ankerproteinen (AKAP) größtenteils an subzelluläre Strukturen gebunden, wodurch eine räumliche Regulation der PKA-Aktivität erreicht wird (zusammenfassend in: Coghlan et al., 1993, Edwards and Scott, 1999). Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen RI und RII ist die Phosphorylierbarkeit durch die C-Untereinheiten und damit der Mechanismus der Inhibition. Die RII-Untereinheiten sind selbst Substrate für die katalytischen Untereinheiten der PKA und werden bei der Holoenzymbildung phosphoryliert, was die Affinität für die C-Untereinheit um etwa eine Größenordnung verringert (Rangel-Aldao und Rosen, 1976). Die RI-Untereinheiten sind dagegen Pseudosubstrate, bei denen der zu phosphorylierende Aminosäurerest in der Konsensussequenz durch einen Alaninrest ersetzt ist (Arg-Arg-X-*Ala*; Titani et al., 1984) und benötigen Mg²⁺ und ATP für die hochaffine Bindung, die synergistisch abläuft (Herberg und Taylor, 1993).

Die RI α -Untereinheit zeichnet sich darüber hinaus durch einen, verglichen mit den übrigen R-Untereinheiten, höheren Umsatz in der Zelle aus. Bei der Dissoziation von den C-Untereinheiten wird die schnelle Degradation der im Holoenzym deutlich stabileren RI α -Untereinheit induziert (Hegde et al., 1993; Amieux et al., 1997). Umgekehrt wird die Expression von RI α von den katalytischen Untereinheiten der PKA über die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB (cAMP-responsive element binding protein) positiv reguliert (Tasken et al., 1991). Dies führt bei erhöhter Aktivität von C-Untereinheiten zu einer verstärkten Neusynthese von RI α -Untereinheiten, ein weiteres Beispiel für die Autoregulation der PKA über negative Rückkopplungsmechanismen.

Im Rahmen der regulatorischen Untereinheiten ist noch ein weiteres regulatorisches Polypeptid von Bedeutung: der hitzestabile Proteinkinaseinhibitor (PKI; Walsh et al, 1990). Dieses relativ kleine Protein (8 kDa) bindet MgATP-abhängig mit hoher Affinität an die freie C-Untereinheit (Herberg and Taylor, 1993; Walsh et al. 1990) und hemmt diese in ihrer Aktivität, da es wie die RI-Untereinheiten über eine Pseudosubstratbindestelle verfügt. Für eine effiziente Inhibition der katalytischen Untereinheit der PKA ist dabei der Bereich ausreichend, der die Aminosäurereste 5-24 umfasst. Dies macht man sich bei der Einschrittreinigung der katalytischen Untereinheiten zunutze, bei der die C-Untereinheiten in Gegenwart von MgATP spezifisch an ein immobilisiertes PKI(5-24)-Peptid gebunden ($K_i = 2$ nM) und anschließend spezifisch eluiert werden (siehe 2.5.8, Olsen and Uhler, 1989).

Die physiologische Bedeutung des PKI scheint hauptsächlich in der zellzyklusabhängigen Kontrolle der PKA-Aktivität im Zellkern zu liegen. Über ein Kernexportsignal (*Nuclear export signal,* NES; Wen et al, 1995a) kann der PKI den Export von freien C-Untereinheiten aus dem Zellkern ins Cytoplasma vermitteln (Fantozzi et al., 1994). Da die Expression des PKI-Gens zellzyklusabhängig ist und am G2/M-Übergang ein Maximum erreicht, ist zu diesem Zeitpunkt auch die Inhibition der C-Untereinheit maximal, eine notwendige Voraussetzung für den Eintritt der Zelle in die Mitose (Wen et al., 1995b).

1.3.2 Die katalytischen Untereinheiten der PKA

1.3.2.1 Isoformen der C-Untereinheiten

Wie für die regulatorischen sind auch für die katalytischen Untereinheiten mehrere Isoformen bekannt. In Säugern wurden bislang drei Gene identifiziert, die katalytische Untereinheiten der PKA codieren: C α , C β und C γ (Shoji et al., 1981; Showers and Maurer, 1986, Uhler et al., 1986a, Beebe et al., 1990). Im Falle von C α wurde zudem eine C-terminal verkürzte Spleißvariante beschrieben (Thomis et al., 1992), sowie die Spleißvariante C α -s, die in humanen Spermatocyten gefunden wurde (Reinton et al., 2000). Bei der C β -Untereinheit wurde mit der 46 kDa großen bovinen Spleißvariante C β 2 die bislang größte Isoform der PKA in Säugetieren identifiziert (Wiemann et al., 1991). Darüber hinaus wurden vor kurzem vier weitere humane C β -Spleißvarianten beschrieben (C β 3, C β 4, C β 4ab und C β 4abc), die wie C β 2 durch alternatives Spleißen von Exon 1 entstehen (Ørstavik et al., 2001).

Während die C α -Untereinheit in bisher allen daraufhin untersuchten Geweben als Hauptisoform nachgewiesen werden konnte, zeigen die C β -Untereinheiten ein spezifischeres Expressionsmuster. So wird die C β 1-mRNA hauptsächlich im Hirn transkribiert, konnte jedoch auch in allen untersuchten Geweben gefunden werden (Uhler et al, 1986b), während die C β 2-mRNA hauptsächlich in Herz- und Hirngewebe nachgewiesen werden konnte, in geringerem Maße auch in Milz- und Skelettmuskelgewebe (Wiemann et al., 1991), was auch auf Proteinebene bestätigt werden konnte (Thullner et al., 2000). Die neuen Spleißvarianten C β 3 und C β 4 scheinen dagegen ausschließlich im Hirn exprimiert zu werden (Ørstavik et al., 2001). Die C γ -Isoform wurde bislang einzig in humanen Testes nachgewiesen (Beebe et al., 1990). Die einzelnen Isoformen weisen sehr große Homologie untereinander auf, so sind die bovine C α - und C β 1-Untereinheit auf Aminosäureebene zu 93% identisch (Showers and Maurer, 1986), C α und C γ zu 83%, sowie C β 1 und C γ zu 79% (Beebe et al., 1990). Die nichtkonservierten Aminosäurereste sind dabei überwiegend außerhalb der katalytischen Kernregion an den N- und C-Termini der Proteine zu finden.

1.3.2.2 Struktur der Ca-Untereinheit

Die C α -Untereinheit war die erste Proteinkinase überhaupt, deren Kristallstruktur geklärt werden konnte (Knighton et al., 1991). Weitere Kristallstrukturanalysen des sogenannten "ternären Komplexes" aus Enzym, Kosubstrat und (Pseudo-)Substrat, der die katalytisch aktive Konformation der Kinase repräsentiert, haben das Verständnis von Proteinstruktur und –funktion weiter verbessert (Bossemeyer et al., 1993, Zheng et al, 1993). Da der katalytische Kern, der sich bei der 350 Aminosäurereste großen C α -Untereinheit von AS 42-297 erstreckt, bei allen bekannten Proteinkinasen konserviert ist, dient die C α -UE als Modellsystem für die gesamte Proteinfamilie.

Das Enzym ist in zwei große Domänen unterteilt, zwischen denen sich eine tiefe Einbuchtung befindet, in der das Nukleotid gebunden wird (Abbildung 2). Die kleinere N-terminale Domäne weist einen großen Anteil an β -Faltblattstrukturen auf und bildet den oberen Teil der Nukleotidbindungstelle aus, während die größere, vorwiegend α -helikale C-terminale Domäne für die Substratbindung und die Katalyse essentielle Aminosäurereste enthält. Die Katalyse selbst findet im Zwischenraum zwischen den beiden Domänen statt, wo das γ -Phosphat des ATP-Moleküls in unmittelbare Nähe zur Substrataminosäure gebracht wird. In diesem Bereich finden sich auch die meisten hochkonservierten Aminosäuren der Proteinkinasefamilie, wo sie zur Nukleotidbindung und zum Phosphattransfer beitragen.

Der N-Terminus des Proteins bildet eine lange α -Helix (A-Helix), die auf der dem aktiven Zentrum abgewandten Seite die beiden Domänen umspannt und dabei eine hydrophobe Oberfläche abdeckt.



Abbildung 2: Struktur der nativen katalytischen Untereinheit Cα aus Schweineherz im Komplex mit MnAMP-PNP und PKI(5-24)-Peptid (Bossemeyer et al., 1993)

Das Protein- bzw. Peptidrückgrat ist in der Schlauch-Darstellung gezeigt, β -Faltblattstrukturen sind als Pfeile, α -Helices als Zylinder zu erkennen. Das PKI(5-24)-Peptid ist grün dargestellt. Die Reste Arg14 und Arg15 des Inhibitorpeptids, sowie der phosphorylierte Thr197-Rest im Aktivierungssegment von C α sind in der Stäbchen-Darstellung zu sehen. Das ATP-Analogon und die Myristylsäure sind als Kalottenmodelle dargestellt. Das katalytische Zentrum ist dem Betrachter zugewandt, die A-Helix verläuft an der Rückseite des Proteins. Der Glycin-reiche Loop umfasst die β -Stränge 1 und 2, die C-Helix ist hinter dem ATP-Analogon zu sehen.

1.3.2.3 Posttranslationale Modifikationen

An ihrem N-Terminus ist die C α -Untereinheit myristyliert, tatsächlich war sie das erste Enzym, an dem diese posttranslationale Modifikation entdeckt wurde (Carr et al. 1982). Die genaue biologische Funktion dieser Myristylierung ist noch unklar. Eine damit verbundene Membranassoziation konnte bislang nicht gezeigt werden, allerdings wird durch sie die Bindung an Liposomen in Gegenwart von RII-Untereinheiten verstärkt (Gangal et al., 1999). Auch die Thermostabilität des Enzyms wird gegenüber der nichtmyristylierten Form leicht erhöht (Yonemoto et al., 1993). Nichtmyristylierte Formen der C α -Untereinheit, z.B. rekombinant hergestelltes Enzym, zeigen keinerlei Unterschiede in Aktivität, Holoenzymbildung und Aktivierung durch cAMP. Sowohl C β 1 als auch C γ tragen ein Myristylierungsmotiv am N-Terminus, so dass eine derartige Modifikation auch dieser C-UE anzunehmen ist.

Neben der Myristylierung trägt die C α -UE im nativen Enzym zwei phosphorylierte Aminosäurereste, Thr 197 und Ser 338 (Shoji et al., 1979, 1981). Die Phosphorylierung an Thr197 ist nicht nur essentiell für die katalytische Aktivität des Enzyms, sondern vermutlich bereits für die korrekte Ausbildung der Tertiärstruktur des Enzyms während der Expression (Steinberg et al., 1993). Dabei handelt es sich vermutlich um eine intermolekulare, cotranslationale Autophosphorylierung, da C α -Mutanten, die die Fähigkeit zur Autophosphorylierung nicht besitzen, durch Coexpression mit dem Wildtyp-Protein aktiviert werden können, nicht aber *in vitro* (Girod et al., 1996). Die Funktion der zweiten Phosphorylierungsstelle außerhalb des katalytischen Kerns bei Ser338 ist dagegen bislang noch unklar, sie scheint jedoch von Bedeutung für die Stabilität des Enzyms zu sein (Yonemoto et al., 1997). Bei der rekombinante Expression in *E. coli* treten außerdem zwei weitere Phosphorylierungen auf, an Ser10 und Ser139, die auf Autophosphorylierung des Enzyms zurückzuführen sind, aber keinen Einfluss auf die katalytische Aktivität haben (Yonemoto et al., 1997).

Eine weitere, ungewöhnliche Modifikation ist die Deamidierung des Asparaginrestes an Position 2 zu Aspartat, der bei etwa 30% der C α - und C β 1-Untereinheiten zu finden ist (Kinzel et al., 1987, Hotz et al., 1989, Jedrzejewski et al., 1998). Diese Modifikation scheint sich auf die intrazelluläre Lokalisation des Enzyms auszuwirken (Pepperkok et al., 2000).

Die Vielzahl an Isoformen der katalytischen Untereinheiten, die durch posttranslationale Modifikationen noch erhöht wird, zeigt die Komplexität der cAMP-abhängigen Proteinkinase und der von ihr vermittelten Signaltransduktion. Bislang lag das Hauptaugenmerk bei Untersuchungen der PKA auf der C α -Untereinheit. Die Entdeckung neuer Spleißvarianten der C β -Untereinheit macht jedoch deutlich, dass eine genauere Betrachtung dieser Isoform unerlässlich für unser Verständnis dieser Proteinkinase ist.

1.3.3 Die katalytischen Untereinheiten C β 1 und C β 2

Während die C β 1-UE, die als erste Isoform von C α kloniert wurde, wie diese ein Molekulargewicht von etwa 40 kDa bei einer Größe von 350 AS aufweist, stellt C β 2 mit 46 kDa und 397 AS eine Besonderheit unter den C-Untereinheiten aus Säugerzellen dar. Sie wurde erstmals von Wiemann et al. (1991) als cDNA-Klon aus Rinderherz beschrieben und war die erste klonierte Spleißvariante einer katalytischen Untereinheit der PKA.

Ein grundlegendes Problem bei der Untersuchung der verschiedenen Isoformen ist ihre große Homologie, die es praktisch unmöglich macht, sie über konventionelle biochemische Reinigungsmethoden voneinander zu trennen. Heute kann diese Schwierigkeit häufig über die rekombinante Expression des fraglichen Proteins umgangen werden, dies ist jedoch nicht immer möglich. Über die C β 1-Untereinheit konnten durch die rekombinante Expression in *E. coli* bereits grundlegende Daten erhoben werden (Gamm et al., 1996). So zeigte die rekombinante C β 1-Untereinheit etwas höhere K_M-Werte für verschiedene Peptidsubstrate als C α und höhere IC₅₀-Werte (50 % inhibitorische Konzentration) bei Inhibition durch PKI(5-24)-Peptid und die RII α -Untereinheit. RII α_2 /C β 1₂-Holoenzyme wiesen einen 5fach niedrigeren K_a-Wert für cAMP auf als RII α_2 /C α_2 Holoenzyme, was eine Aktivierung der C β 1-UE bereits bei geringeren cAMP-Konzentrationen zur Folge hat.

Eine von Cα verschiedene biologische Funktion der Cβ1-Untereinheit konnte in transgenen Mäusen durch Ausschalten ("knock-out") des Cβ-Gens über eine Insertion in Exon 1 gezeigt werden (Qi et al. 1996). Diese Mäuse waren normal lebensfähig, wiesen jedoch Defizite bei der Gedächtnisbildung auf, ein Befund, der mit der vorwiegenden Expression des Gens im Hirngewebe, speziell im Hippocampus übereinstimmt. Auf neuronaler Ebene zeigten die Mäuse neben anderen Effekten eine stark verminderte Langzeitpotenzierung (long term potentiation, LTP) in bestimmten Bereichen des Hippocampus. Interessanterweise ist die für die Gedächtnisbildung wichtige späte Phase der LTP proteinsyntheseabhängig und die Proteinsynthese bei der Gedächtnisbildung ist CRE (cAMP-responsive element)-vermittelt, so dass über den Transkriptionsfaktor CREB, der ein Substrat der C-Untereinheiten ist, eine mögliche funktionelle Verbindung besteht (DeZazzo and Tully, 1995).

Die C β 2-Untereinheit unterscheidet sich von C β 1 nur in der N-terminalen Sequenz; die ersten fünfzehn Aminosäurereste der C β 1-Sequenz sind durch 62 Reste ersetzt, die keinerlei Homologie zu anderen bekannten Proteinen aufweisen (vgl. auch Abbildung 4). Die Stelle, an der die beiden Proteine voneinander abweichen, entspricht auf DNA-Ebene dem Exon1/Exon2 Übergang und die cDNA von C β 1 und C β 2 sind 3' von dieser Stelle identisch, weichen also ebenfalls nur im 5' Bereich voneinander ab. Da im C β -Gen das C β 2 Exon 1 5' vom C β 1 Exon1 liegt, wobei es jeweils einen eigenen Promotorbereich gibt, entstehen die beiden Spleißvarianten vermutlich durch die Benutzung alternativer Promotoren und (im Fall von C β 2) anschließendes alternatives Spleißen (Wiemann et al. 1996).

Da die 62 N-terminalen Aminosäuren von C β 2 keine Homologie zu anderen Proteinen aufweisen, ist ihre Funktion unbekannt. Es fehlt im Gegensatz zu den anderen Isoformen auch ein N-terminales Glycin, das für eine Myristylierung benötigt würde. Aufgrund von Strukturvorhersagen lässt sich die Bildung von drei α -Helices vermuten, von denen eine amphiphiler Natur ist (Wiemann et al., 1991). Amphipathische Helices finden sich als A- Helix Motiv in den meisten Proteinkinasen und stellen vermutlich ein konserviertes Strukturmotiv dar (Veron et al., 1993, vgl. auch 1.3.2.2).

Wie bereits erwähnt, wurden C\u00b32-Transkripte vorwiegend in Hirn-, Herz- und Milzgewebe gefunden (Wiemann et al., 1991), was durch Untersuchungen mit einem CB2-spezifischen Antikörper auch auf Proteinebene größtenteils bestätigt wurde (Thullner, 1997 und Thullner et al. 2000). Dennoch macht das Cβ2-Protein nur einen Bruchteil der C-Untereinheiten in diesen Geweben aus, was die Charakterisierung sehr erschwert. Versuche zur rekombinanten Expression in E. coli resultierten in proteolytisch abgebautem Protein (Thullner, 1997). Dennoch konnte gezeigt werden, dass CB2 typische Merkmale einer katalytischen Untereinheit der PKA aufweist. So zeigte C^β2 in Präparationen gereinigter C-Untereinheiten aus Rinderherzgewebe in renaturierten SDS-Polyacrylamidgelen Kinaseaktivität vergleichbar mit der von Ca und CB1. Die Kinaseaktivität ist MgATP-abhängig und kann durch PKI(5-24)-Peptid inhibiert werden. Die Menge an CB2, die aus Gewebeextrakten an eine PKI(5-24)-Affinitätsmatrix gebunden werden kann, ist abhängig von der cAMP-Konzentration und damit von der Dissoziation von den R-Untereinheiten (Thullner, 1997). Des weiteren konnte über massenspektrometrische Methoden die Existenz zweier Phosphorylierungsstellen an Thr 244 und Ser385 nachgewiesen werden, die den bekannten Phosphorylierungsstellen aus Ca (Thr197 bzw. Ser338) entsprechen und damit auch eine ähnliche Funktion übernehmen dürften. Eine biologische Funktion von CB2 konnte durch stabile Transfektion eines CB2 Expressionsvektors in die CHO₁₀₂₆₀-Zellinie nachgewiesen werden. Diese Zelllinie zeigt aufgrund eines Mangels an funktioneller C α -mRNA und der daraus resultierenden geringeren PKA-Aktivität einen cAMP-insensitiven Phänotyp (Gottesmann et al., 1980, Howard et al., 1991). Durch die stabile Transfektion von CB2 konnten die meisten - aber nicht alle - der mit der normalen cAMP-Antwort verbundenen Veränderungen morphologischen wiederhergestellt werden (Thullner, 1997).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Zielsetzung der Arbeit war die weitergehende Charakterisierung der C β -Isoformen der katalytischen Untereinheit der PKA insbesondere im Hinblick auf mögliche funktionelle Unterschiede untereinander und zur Hauptisoform C α . Die vergleichende Untersuchung dieser Isoformen ist besonders interessant, da zwar die C α -Isoform als Modell für die gesamte Kinasefamilie ausgiebig charakterisiert wurde, über die C β -Isoformen bislang nur sehr wenig

bekannt ist und isoformspezifische Eigenschaften kaum beschrieben wurden. Da es noch weitgehend unklar ist, wie durch das Signalmolekül cAMP eine solche Vielzahl unterschiedlicher zellulärer Antworten hervorgerufen werden kann, könnte diese Untersuchung dazu beitragen, das Verständnis der Funktionsweise des cAMP-Signalweges zu verbessern.

Daher war es zunächst erforderlich, die rekombinante Expression sowohl von C β 1 als auch von C β 2 zu etablieren, entweder durch Optimierung bereits bestehender Expressionssysteme oder gegebenenfalls unter Anwendung neuer Methoden. Um eine biochemische Charakterisierung durchzuführen, muss das Protein anschließend zur Homogenität gereinigt werden. Ziel war es, die bereits mit nativer C β 2-Untereinheit erhaltenen Daten mit rekombinant hergestelltem Protein zu bestätigen und zu erweitern, wobei das Hauptaugenmerk auf dem Vergleich mit den beiden anderen verwendeten Isoformen liegen sollte, besonders im Hinblick auf mögliche funktionelle Unterschiede. In Untersuchungen zur Substratspezifität wurde angestrebt, isoform-spezifische Interaktionspartner zu identifizieren.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Materialien für die Molekularbiologie

2.1.1.1 Medien und Nährböden zur Bakterienanzucht

Die Medien wurden mit deionisiertem, destilliertem Wasser angesetzt und autoklaviert.

LB-Medium: 1% Trypton 0,5% Hefe-Extrakt 1% NaCl

LB-Agar: LB-Medium mit 1,5 % Bacto-Agar

SOC-Medium:2%Trypton0,5%Hefe-Extrakt10 mMNaCl2,5 mMKCl10 mMMgCl210 mMMgSO420 mMGlucose

NZY+-Medium: 1% Caseinhydrolysat
0,5% Hefe-Extrakt
0,5% NaCl
12,5 mM MgCl₂
12,5 mM MgSO₄
20 mM Glucose

Zur Selektion wurde den Nährmedien bzw. -böden nach dem Abkühlen auf wenigstens 60°C die jeweiligen Antibiotika (alle Applichem, Darmstadt) in folgenden Konzentrationen zugegeben:

Carbenicillin : 50 µg/ml Kanamycin : 50 µg/ml Chloramphenicol : 30 µg/ml

2.1.1.2 Bakterienstämme

E. coli BL21 (DE3) *E. coli* BL21 (DE3) pLysS *E. coli* XL1 Blue Novagen, Schwalbach/Ts. Novagen, Schwalbach/Ts. Stratagene, Heidelberg

2.1.1.3 Enzyme

Restriktionsendonukleasen *Taq*-Polymerase *Pfu*-Polymerase T4 DNA-Ligase

2.1.1.4 Vektoren und Plasmide

pET28b(+) pT7-7 pASK-IBA6 pASK-IBA7 pBlueBac4.5

pT7-7/Cα pET28b/Cβ2 pSG5/Cβ1 AGS-Hybaid, Heidelberg AGS-Hybaid, Heidelberg Stratagene, Heidelberg AGS-Hybaid, Heidelberg

Novagen, Schwalbach/Ts. Stan Tabor IBA, Göttingen IBA, Göttingen Invitrogen, Leek, NL

Andreas Girod, DKFZ Sandra Thullner, DKFZ Stefan Wiemann, DKFZ

2.1.1.5 Kits

Plasmid Mini- und Midi Prep Kit	Qiagen, Hilden
PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Bac-N-Blue Transfection Kit	Invitrogen, Leek, NL
S.N.A.P. Midi prep Kit	Invitrogen, Leek, NL
Dneasy Kit	Invitrogen, Leek, NL
Strep-tag II Expressionssystem	IBA, Göttingen

2.1.1.6 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von Herrn Dr. Wolfgang Weinig, DKFZ, synthetisiert und FPLC-gereinigt.

Primer zur Klonierung von Cβ2 und Cβ1:

Bam-beta-RP1:	5'ttg	gat	cct	aga	att	cac	aaa	att	ctt	tcc			
Cβ2-BsaI-FP:	5'aag	aag	gtc	tca	gcg	atg	gca	gct	tac	aga	gaa	gta	
Cβ2-BsaI-RP:	5'gag	ctg	gtc	tcc	tat	cac	tag	aat	tca	caa	aat	tct	t
Cβ2-XbaI:	5'gcg	ctc	tag	atg	gca	gct	tac	aga	gaa	gta			
Cβ1-NdeI:	5'ata	tca	tat	ggg	gaa	cgc	ggc	gac	С				

Sequenzierungsprimer für pBlueBac4.5:

PH-Fwd:	5'	aaa	tga	taa	сса	tct	cgc
Baculo Rev:	5'	act	tca	agg	aga	att	tcc

PCR-Primer zur Überprüfung rekombinanter AcNPV-DNA:

Bac-Fwd (-44):	5'	ttt	act	gtt	ttc	gta	aca	gtt	ttg
Bac-Rev (+778):	5'	caa	caa	cgc	aca	gaa	tct	agc	

Primer für die Mutagenese von Asp59, Arg60 und Ser61 zu Ala:

D59A-I	5' o	cat	act	gcc	tta	tgg	gcc	aga	tca	atg	aaa	gag		
D59A-II	5' (ctc	ttt	cat	tga	tct	ggc	сса	taa	ggc	agt	atg		
R60A-I	5' (cat	act	gcc	tta	tgg	gac	gca	tca	atg	aaa	gag	ttt	С
R60A-II	5' g	gaa	act	ctt	tca	ttg	atg	cgt	ссс	ata	agg	cag	tat	g

S61A-I	5'	ctg	cct	tat	ggg	aca	gag	caa	tga	aag	agt	ttc	tag
S61A-II	5'	cta	gaa	act	ctt	tca	ttg	ctc	tgt	ссс	ata	agg	cag

2.1.2 Materialien und Geräte für die Zellkultur

Sf9 Insektenzellen	Invitrogen, Leek, NL
TNM-FH Insect cell Medium	Sigma, Deisenhofen
Fötales Kälberserum (für Insektenzellkultur)	GibcoBRL, Eggenstein
Gentamycin-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Zellkulturflaschen und –schalen	Nunc, Wiesbaden
Spinnerflaschen	Wheaton, Millville, NJ, USA
Zellschaber	Nunc, Wiesbaden
Wärmeschrank B6200 für Sf9 Zellkultur	Heraeus, Hanau
Magnetrührer Variomag Biosystem B	
und externe Steuerung Biomodul 40 B	Neolab, Heidelberg
Sterilbank "SterilCard Hood"	Baker Co, Sanford, Maine, USA

2.1.3 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von der Firma Sigma (Deisenhofen) und im höchsten Reinheitsgrad bezogen.

Affi-Gel 10, Affi-Gel 15	BioRad, München
Agarose	AGS-Hybaid, Heidelberg
Acrylamidfertiglösung	National Diagnostics,
(30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid (w/v))	Atlanta, USA
Amidoschwarz	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Baculovirus Agarose	Invitrogen, Leek, NL
γ- ³² P-ATP, 5000 Ci/mmol	Amersham, Braunschweig
Borsäure	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Complete [™] Protease-Inhibitoren	Roche Diagnostics, Mannheim
Coomassie Brilliant Blau R 250 (Serva Blau)	Serva, Heidelberg
Dithiothreitol	Applichem, Darmstadt

Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
2-Morpholino-ethansulfonsäure (MES)	Applichem, Darmstadt
3-Morpholino-propansulfonsäure (MOPS)	Applichem, Darmstadt
Natriumchlorid	Serva, Heidelberg
PEG 8000	Applichem, Darmstadt
Szintillationscocktail Aquasafe 500	Zinsser, Frankfurt
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Applichem, Darmstadt

2.1.4 Peptide

Kemptid	LRRASLG
PKI(5-24)	TTYADFIASGRTGRRNAIHE
Cα(35-46)	QNTAHLDQFERIC
Cβ(35-46)	PNNAGLEDFERKC
Cβ(63-68)	KATEQYGGC

2.1.5 Vorgefertigte Materialien

BAS-MP 2040 PhosphoImaging Plate	Fujifilm, Tokyo, Japan
ECL-Chemilumineszenz Detektionssystem	NEN Life Science
Röntgenfilme Kodak X-Omat AR	Siemens, Stuttgart
Polaroidfilme 667	Siemens, Stuttgart
PVDF(Polyvinyldifluorid)-Membran	Millipore, Eschborn
Protein-Molekulargewichtsstandards:	
Low Molecular Weight marker	Pharmacia, Freiburg
Low Molecular Weight marker, prestained	BioRad, München

AGS-Hybaid, Heidelberg

GibcoBRL, Eggenstein

BioRad, München

DNA-Größenstandards: Biosizer VI (λ Hind III) 1 kB DNA-Leiter Einweg-Chromatographie-Säulen (leer)

2.1.6 Laborgeräte

Wärmeschrank für Bakterienkultur MELAG TypA	Neolab, Heidelberg
BAS-1500 Reader (Phosphoimager)	Fujifilm, Tokyo, Japan
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
E/A Autoreader EL 310	Biotek Instruments, USA
Elektroblot-Apparatur Semi-Dry	BioRad, München
Geltrockner Modell 583	BioRad, München
Mini-PROTEAN II Elektrophoresekammern	BioRad, München
Agarose-Gelelektrophoresekammern	AGS-Hybaid, Heidelberg
Entwicklermaschine	Amersham, Braunschweig
Flüssigszintillationszähler	LKB-Wallace, Gräfeling
PCR-Gerät	Perkin-Elmer, Überlingen
Phasenkontrastmikroskop Leitz Diavert	Leitz, Wetzlar
Semi-Dry Trans Blot Apparatur	BioRad, München
Sorvall-Zentrifuge RC3B mit H-4000 Rotor	DuPont, Bad Nauheim
Sorvall-Zentrifuge RC5B mit SS34 Rotor	DuPont, Bad Nauheim
Schüttelinkubator	Infors GmbH, Stuttgart
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Thermoblock Techne Dri-Block	Kurt Migge GmbH, Heidelberg
Ultraschallgerät, Sonifier Cell Disruptor B15	Branson, Connecticut, USA

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsverdaus von DNA wurden für Klonierungen und zur Analyse von Plasmiden durchgeführt. Dazu wurde die DNA mit Restriktionsenzymen inkubiert, die spezifische Sequenzen (4-8 bp lang) erkennen und spalten. Die so entstehenden DNA-Fragmente können anschließend mittels Agarosegelelektrophorese analysiert und für Klonierungen auch wieder aus der Agarose eluiert werden (2.2.3).

Das Volumen der Reaktionsansatz betrug im allgemeinen 20 μ l und wurde unter den vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen im mitgelieferten Reaktionspuffer durchgeführt. Pro μ g zu verdauender DNA wurden dazu 2-5 Units der benötigten Restriktionsenzyme eingesetzt. Die Reaktion wurde entweder durch Erhitzen (10 min bei 65 bzw. 80°C) oder durch Zugabe von 5 μ l 5x DNA-Probenpuffer gestoppt.

2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese erlaubt die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe in einem elektrischen Feld. Sie wurde zur Analyse von Restriktionsverdaus und der Trennung von DNA-Fragmenten zur anschließenden Elution bei Klonierungen eingesetzt. Im allgemeinen wurden 1%ige Agarosegele verwendet, die eine gute Trennung im Bereich zwischen 1000 und 8000 bp erlauben. Bei kleineren Fragmenten wurden 1,5 %ige Gele verwendet.

Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1x TBE-Puffer durch Kochen in einem Mikrowellenherd gelöst. Der heißen Agaroselösung wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 1 μ g/ml zugesetzt und die Lösung in eine Gelkammer gegossen. Zur Ausformung von Probentaschen wurden Plastikkämme eingesetzt. Nach dem Aushärten der Agarose wurden die Kämme entfernt, das Gel in der Gelkammer mit 1x TBE-Laufpuffer bedeckt und die mit 5x DNA-Probenpuffer versetzten DNA-Proben in die Probentaschen aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 10 V/cm Gellänge für 1 Stunde durchgeführt.

Anschließend wurde die Auftrennung unter UV-Licht (260 nm) analysiert. UV-Licht regt das in die DNA-Fragmente interkalierte Ethidiumbromid zu einer orangeroten Fluoreszenz an, was die Detektion der Fragmente ermöglicht. Zum Vergleich wurden als Größenstandards eine 1 kB Leiter (Gibco BRL) und HindIII-geschnittene λ -DNA (AGS-Hybaid) aufgetrennt. Sollte die DNA zur Klonierung verwendet werden, fand die Detektion unter langwelligem (energieärmeren) UV-Licht statt. Die Dokumentation der Gelelektrophorese erfolgte mittels Polaroid-Fotografie.

2.2.3 Elution von DNA aus Agarosegelen

Zur Klonierung vorgesehene DNA-Fragmente wurden mit den QiaQuick Gel Extraction Kit aus Agarosegelen gereinigt. Bei diesem Verfahren wird die Agarose zunächst aufgelöst, die darin enthaltene DNA bindet in Gegenwart chaotroper Salze an eine Silicagel-Matrix aus der sie anschließend unter Niedrigsalzbedingungen wieder eluiert wird (Vogelstein und Gillespie, 1979).

Die zu reinigende DNA-Bande wurde unter langwelligem UV-Licht (340 nm) aus dem Agarosegel ausgeschnitten. In einem Eppendorfgefäß wurden pro 100 mg Gel 300 μ l Puffer QX1 (3 M NaI, 4 M NaClO₄, 0,1% Na₂S₂O₃, 10 mM Tris pH 7) zugegeben und für 10 min bei 50°C erhitzt, um die Agarose aufzulösen. Zur Beschleunigung dieses Vorgangs wurde der Ansatz mehrfach gevortext. Nach Zugabe von 100 μ l Isopropanol pro 100 mg Gel wurde die Lösung in eine "QiaQuick-Spin" Säule überführt, die in ein 2 ml Reaktionsgefäß eingesteckt war. Es folgte eine einminütige Zentrifugation bei 13000 Upm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge. Der Säulendurchlauf wurde verworfen, die Säule mit 750 μ l Puffer PE gewaschen (1 min, 13000 Upm) und anschließend in ein frisches 1,5 ml Eppendorfgefäß eingesetzt. Die Elution der DNA von der Säule erfolgte mit 30 μ l TE-Puffer. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde die Säule vor der Zentrifugation 1 min bei RT inkubiert. Die so gewonnene DNA ist sofort für Klonierungen einsetzbar.

2.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation werden mit Hilfe des Enzyms T4 DNA-Ligase zueinander kompatible oder stumpfe DNA-Enden unter ATP-Verbrauch miteinander verknüpft. Dies nutzt man bei der Klonierung von Genen in Plasmidvektoren aus.

Ein typischer Ligationsansatz enthielt 2 μ l 10 x Ligasepuffer (660 mM Tris-HCl pH 7,9, 50 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 10 mM ATP), 1 U T4 DNA-Ligase, 100-200 ng des gespaltenen Plasmid-Vektors und das zu klonierende Fragment in 1-5fachem molarem Überschuss. Der Reaktionsansatz wurde mit destilliertem Wasser auf 20 μ l aufgefüllt und 2 h bei RT (bei

überhängenden DNA-Enden) oder über Nacht bei 14°C (bei stumpfen DNA-Enden) inkubiert. In Kontrollansätzen war geschnittener Vektor sowie Vektor und zu klonierendes Fragment jeweils ohne Ligase enthalten.

2.2.5 Herstellung kompetenter Bakterien

Kompetente Bakterien sind in der Lage Fremd-DNA aufzunehmen, eine Tatsache, die bei der Transformation von Bakterien (2.2.6) genutzt wird. Der genaue Mechanismus dieses Vorgangs ist nicht bekannt. Eine einfache Methode, um Bakterien kompetent zu machen, ist die CaCl₂-Methode (Mandel und Higa 1970, Cohen et al. 1972). Bei dem hier beschriebenen Protokoll handelt es sich um eine Variante dieser Methode.

benötigte Lösungen (sterilfiltriert!):

TFB I:	KOAc KCl CaCl ₂ MnCl ₂ ·2H ₂ C	30 mM 100 mM 10 mM 50 mM	pH 5,8 ; einzustellen mit CH ₃ COOH
TFB II:	MOPS KCl CaCl ₂ Glycerol	10 mM 10 mM 75 mM 15%	pH 6,5 ; einzustellen mit KOH

100 ml SOC-Medium wurden mit 1 ml einer ÜN-Kultur der Escherichia Coli-Stämme XL1-Blue bzw. BL21 (DE3) beimpft und bei 37°C und 220 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 wachsen gelassen. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Kultur auf Eis gekühlt und anschließend bei 3000 Upm und 4°C für 5 min abzentrifugiert (Sorvall Zentrifuge, GS3-Rotor). Der 30 Kulturüberstand wurde verworfen, das Bakterienpellet ml eiskaltem in Transformationspuffer I (TFB I) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation wie zuvor, wonach das Zellpellet in 4 ml eiskaltem TFB II aufgenommen wurde.

Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgte in 100 µl Aliquots bei -80°C.

2.2.6 Transformation kompetenter Bakterien

Bei der Transformation kompetenter Bakterien nehmen diese die ihnen angebotene Plasmid-DNA auf. Die Plasmide tragen neben den für die Propagation nötigen Sequenzen auch ein Antibiotikaresistenzgen, welches die Selektion auf erfolgreich transformierte Bakterien ermöglicht.

Die gefrorenen kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, bevor 5 μ l eines Ligationsansatzes oder 1 ng gereinigter Plasmid-DNA zupipettiert und mit der Pipettenspitze vorsichtig durchmischt wurden. Es folgte eine 30 minütige Inkubation auf Eis, ein Hitzeschock für 90 s bei 42°C und eine weitere Inkubation auf Eis für 2 min. Nach Zugabe von 900 μ l SOC-Medium wurden die Bakterien für 30-60 min bei 37°C geschüttelt. 200 μ l dieser Kultur wurden auf LB-Agar ausplattiert, welcher das dem Selektionsmarker entsprechende Antibiotikum enthielt. Anschließend erfolgte eine mindestens 16-stündige Inkubation im Brutschrank bei 37°C (bzw. 30°C bei *E. coli* BL21(DE3)).

2.2.7 Plasmid-Präparation

2.2.7.1 Mini-Präparation (Triton-Koch Methode)

Die Plasmid Mini-Präparation dient der schnellen Gewinnung ausreichender Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien zur Restriktionsanalyse. Dies ermöglicht ein effizientes Screening der aus der Transformation hervorgegangenen Einzelkolonien nach Klonen, die das erwünschte Konstrukt enthalten. Bei der hier beschriebenen Methode handelt es sich um eine modifizierte Triton-Koch Methode (Holmes und Quigley, 1981).

Von LB-Agarplatten aus einer Transformation wurden mit sterilen Zahnstochern Einzelkolonien in 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. 1,5 ml dieser Kulturen wurden in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und für 1 min bei 8000 Upm (Heraeus Biofuge pico) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 µl STET-Puffer (s.u.) resuspendiert. Nach Zugabe von 50 µl Lysozym (20 mg/ml in 50 mM Tris-HCl pH 7,4) und gründlichem Mischen erfolgte eine Inkubation bei RT für 1 min, gefolgt von Erhitzen auf 95°C zum Zerstören der bakteriellen Zellwand und Denaturierung der DNA. Anschließend wurde der Ansatz 5 min auf Eis gekühlt. Diese Behandlung erlaubt es der Plasmid-DNA, zu renaturieren, nicht aber der genomischen DNA. Durch eine 1 minütige Zentrifugation bei 13000 Upm wurden Zelltrümmer und genomische DNA sedimentiert. Der die Plasmid-DNA enthaltende Überstand wurde zur Fällung in ein frische Eppendorfgefäß mit 0,5 ml

Isopropanol überführt. Die Präzipitation erfolgte durch Zentrifugation bei 13000 Upm für 10 min. Nach einem Waschschritt mit 70 % Ethanol wurde das DNA-Sediment luftgetrocknet und anschließend in 40-50 µl TE-Puffer resuspendiert.

Da bei dieser Präparationsmethode auch die bakterielle RNA mitgereinigt wird, wurde bei Restriktionsanalysen der Plasmid-DNA RNAse A in einer Endkonzentration von 10 μ g/ml eingesetzt.

STET-Puffer:	8% Sucrose
	50mM Tris-HCl pH 7,4
	50mM EDTA
	8% Triton X-100

2.2.7.2 Plasmid Präparation mit dem Qiagen Plasmid Midi-Prep Kit

Zur Gewinnung größerer Mengen (bis 100 µg) an Plasmid-DNA wurde das Plasmid Midi-Prep Kit der Firma Qiagen verwendet. Dabei werden die Bakterienzellen durch alkalische Lyse aufgeschlossen und die Plasmid-DNA über Ionenaustauscher-Chromatographie gereinigt.

50 ml einer E. coli ÜN-Kultur wurden bei 4000 x g für 10 min abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 4 ml Puffer P1 (50 mM Tris·Cl pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNAse A) resuspendiert. Zur Lyse der Bakterien wurden 4 ml Puffer P2 (0,2 M NaOH, 1% SDS) zugegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Lysat mit 4 ml Puffer P3 (3 M KAc, pH5,5) neutralisiert und 15 min auf Eis inkubiert. Durch die hohe Ionenstärke fällt das im Lysepuffer enthaltene SDS aus, wobei sowohl Zelltrümmer, als auch Proteine und die denaturierte chromosomale DNA in Salz-Detergens Komplexen eingeschlossen werden, während die viel kleinere Plasmid DNA korrekt renaturiert und in Lösung bleibt. Es folgte eine 30 minütige Zentrifugation bei 20000 x g, nach der der Überstand auf eine mit 10 ml Puffer QBT (0,75 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7, 15 % Isopropanol, 0,15 % Triton X-100) äquilibrierte DEAE-Ionentauschersäule (Qiagen-tip 100) gegeben wurde. Die Säule wurde zweimal mit 10 ml Puffer QC (1 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7, 15 % Isopropanol) gewaschen, um RNA und andere Verunreinigungen zu entfernen. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 5 ml Puffer QF (1,25 M NaCl, 50 mM Tris·Cl pH 8,5, 15 % Isopropanol). Das Eluat wurde durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol und Zentrifugation bei 15000 x g für 30 min gefällt. Nach einem Waschschritt mit 70% Ethanol wurde das DNA-Sediment luftgetrocknet und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer (100-200 µl) resuspendiert.

Die so gewonnene Plasmid-DNA wurde für Sequenzierungen und Transformation kompetenter Bakterien verwendet. Zur Langzeitlagerung wurde sie bei –20°C aufbewahrt.

2.2.7.3 Plasmid Präparation mit dem Invitrogen S.N.A.P. Midi Präp Kit

Für die Transfektion von Sf9-Insektenzellen mit Baculo-Transfervektoren (2.4.3.1) wurde die Plasmid-DNA mit dem S.N.A.P. Kit der Firma Invitrogen aufgereinigt. Das Reinigungsverfahren beruht wie bei Qiagen auf der alkalischen Lyse, gefolgt von Bindung der DNA an eine Säule und Elution unter definierten pH-Bedingungen.

Dazu wurden 50 ml einer E. coli ÜN-Kultur für 10 min bei 4000 x g abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 4 ml Resuspendierungspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 75 µg/ml RNAse A) gelöst. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 4 ml Lysepuffer (0,2 M NaOH, 1 % SDS) und eine dreiminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurden durch die Zugabe von Fällungssalzen (3 M KAc, pH 5,2) und Inkubation auf Eis für 5 min Zelltrümmer, Proteine und genomische DNA ausgefällt. Die erhaltene Lösung wurde zur Filtration in eine Säule A überführt, die in einem 50 ml Falcon Röhrchen für 5 min bei 3000 x g zentrifugiert wurde. Das die Plasmid-DNA enthaltende Filtrat wurde mit 12 ml Bindungspuffer (7,5 M Guanidinium-Hydrochlorid) versetzt und für 2 min bei 1000 x g durch eine in ein Falcon Röhrchen eingesetzte Säule B zentrifugiert, wodurch die DNA an das Säulenmaterial gebunden wurde. Es folgte ein Waschschritt mit 5 ml Waschpuffer 1 (5 M Guanidinium-HCl, 50 mM MOPS pH 7) für 1 min bei 2000 x g, sowie mit 5 bzw. 10 ml Waschpuffer 2 (75 % Ethanol, 25 mM NaCl) für je 2 min bei 2000 x g. Anschließend wurde die Säule für 5 min bei 4000 x g zentrifugiert, um Reste der Waschpuffer zu entfernen. Zur Elution wurde die Säule in ein frisches 50 ml Falcon Röhrchen überführt, 750 µl TE-Puffer auf die Säule gegeben und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor das Eluat durch Zentrifugation bei 4000 x g für 5 min gesammelt wurde.

2.2.8 Baculovirus-DNA Präparation

Zur Präparation rekombinanter Baculovirus-DNA aus dem Kulturüberstand infizierter Sf9-Insektenzellen wurde das EasyDNA Kit der Firma Invitrogen verwendet. Die herkömmlichen Plasmid-Reinigungsmethoden können aufgrund der Größe des viralen Genoms von ca. 130 kB nicht angewendet werden.

Isolierung der Viruspartikel:

750 μ l einer Suspension von infizierten Sf9-Zellen (ca. 2×10⁶ Zellen/ml, 7 Tage p.i.) wurden in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß für 3 min bei 5000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches, steriles 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Zur Fällung der Viruspartikel wurden 750 μ l kaltes 20% PEG 8000 in 1 M NaCl zugegeben, gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Viren wurden durch eine 10minütige Zentrifugation bei 13000 Upm und 4°C in einer Kühlzentrifuge sedimentiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes folgte eine weitere Zentrifugation bei 13000 Upm für 2 min. Die noch vorhandene Flüssigkeit wurde mit einer Pipette vorsichtig abgesaugt und das Virussediment in 100 μ l TE-Puffer resuspendiert.

Isolierung der viralen DNA:

Zu den resuspendierten Viruspartikeln wurden 143 µl Lösung A (Lysepuffer) zugegeben und die Suspension kurz gevortext. Es folgte eine Inkubation bei 65°C für 6 min, danach wurden 58 µl Lösung B (Präzipitationslösung) hinzugefügt und der Ansatz gevortext bis eine homogene Mischung entstand. Nach Zugabe von 258 µl CHCl₃ wurde nochmals gevortext und anschließend für 10 min bei 13000 Upm und 4°C zentrifugiert um die Phasentrennung zu beschleunigen. Die obere (wässrige) Phase mit der viralen DNA wurde in ein frisches 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt.

Es folgte eine Ethanolfällung der DNA (2.2.9), die zum Schluss in 20 μ l TE-Puffer aufgenommen wurde und direkt für weitere Analysen verwendet werden konnte.

2.2.9 Fällen von DNA

DNA kann aus wässrigen Lösungen mit Salz und Alkohol gefällt werden. Die Fällung verläuft auch in verdünnten Lösungen quantitativ und kann so zum Aufkonzentrieren der DNA verwendet werden.

Die DNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumenanteil 3M Natriumacetat pH 5,2 und 2,5 Volumenanteilen 100% Ethanol gemischt und 15-30 min bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch 15minütige Zentrifugation sedimentiert (Tischzentrifuge, 13000 Upm), der Überstand verworfen und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, um Salzreste zu entfernen. Nach erneuter Zentrifugation (5-10 min, 13000 Upm) wurde das DNA Pellet luftgetrocknet und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer gelöst.
2.2.10 Spektrophotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration reiner DNA-Präparationen lässt sich über ihre Extinktion bei 260 nm (A_{260}) sehr genau bestimmen. Ein Maß für die Reinheit der Präparation ist das Verhältnis der Absorption bei 260 zu 280 (A_{260}/A_{280}) , das bei reiner DNA bei 1,8-1,9 liegt. Niedrigere Werte deuten auf Verunreinigung mit Phenol und/oder Proteinen höhere Werte auf eine Kontamination mit RNA hin.

Zur Bestimmung der A_{260} wurde die Probe in TE-Puffer verdünnt und in einem Spektralphotometer gegen eine Referenzküvette mit TE-Puffer gemessen. Der Messwert sollte dabei zwischen 0,1 und 1 liegen. Die DNA-Konzentration lässt sich dann nach folgender Formel berechnen:

bei dsDNA:	$c_{DNA} = A_{260} \times 50 \ \mu g/ml \times Verdünnungsfaktor$
bei Oligonukleotiden:	$c_{DNA} = A_{260} \ge 30 \ \mu g/ml \ge Verdünnungsfaktor$

2.2.11 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Technik der Polymerase Kettenreaktion erlaubt es, in kurzer Zeit große Mengen eines DNA-Segmentes zu amplifizieren, das zwischen zwei bekannten Sequenzen liegt. Dabei bedient man sich hitzestabiler DNA-Polymerasen, die die Automatisierung des Vorgangs ermöglichen (Saiki et al. 1987).

Im ersten Schritt wird die als Matrize (=Template) fungierende DNA durch Erhitzen denaturiert, sodass sich im folgenden Schritt die als Primer für die DNA-Synthese dienenden Oligonukleotide spezifisch an die DNA-Einzelstränge anlagern können (=Annealing). Die beiden Primer müssen so gewählt werden, dass sie die zu amplifizierende Sequenz flankieren, wobei einer komplementär zum codierenden ("*sense*"), der andere komplementär zum nicht codierenden ("*antisense*") Strang sein muss. Auf die Hybridisierung der Oligonukleotide folgt die Synthesereaktion, in der die DNA-Polymerase ausgehend von den 3' OH-Enden der Primer die DNA-Stränge verlängert. Der Zyklus aus Denaturieren, Primerhybridisierung und DNA-Synthese wird 20-30 mal durchlaufen, wobei jeder neu synthetisierte Strang im folgenden Zyklus als Template dienen kann, sodass die gewünschte Sequenz theoretisch exponentiell vermehrt wird. In der Praxis verdoppelt sie sich mit jedem Zyklus, bis sich mehr Primer-Template Komplexe gebildet haben, als das Enzym verlängern kann; dann ist die Zunahme nur noch linear.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR hauptsächlich dazu eingesetzt, um DNA-Sequenzen für eine nachfolgende Klonierung zu amplifizieren. Dazu wurden die als Primer fungierenden Oligonukleotide mit passenden Restriktionsschnittstellen synthetisiert, die eine Klonierung des erhaltenen PCR-Produktes nach einem Restriktionsverdau erlaubten. Als DNA-Polymerase wurde entweder eine *Taq*-Polymerase (AGS-Hybaid, Heidelberg) oder *Pfu*-Polymerase (Stratagene, Heidelberg) eingesetzt. Letztere besitzt aufgrund ihrer 3'-5' Exonukleaseaktivität eine geringere Fehlerrate beim Baseneinbau als die *Taq*-Polymerase.

Ein typischer PCR-Ansatz von 100 μ l setzte sich zusammen aus: 10 ng Template-DNA, 50 pmol (0,5 μ M) jedes Primers, 200 μ M dNTPs, 1,5 mM MgCl₂,10 μ l 10x *Taq-* bzw. *Pfu-*Reaktionspuffer und 1-2,5 U der DNA-Polymerase. Das Reaktionsvolumen wurde mit sterilem deionisiertem Wasser auf 100 μ l aufgefüllt und der Reaktionsansatz mit ca. 50 μ l Paraffinöl als Verdunstungsschutz überschichtet. Bei Problemen mit der Spezifität und Ausbeute der Reaktion wurde die Mg²⁺ Konzentration zwischen 1 und 2,5 mM variiert und/oder 5% DMSO zum Ansatz hinzugefügt.

Die PCR wurde in einem programmierbaren Thermocycler der Firma Perkin-Elmer durchgeführt. Zunächst wurde der Ansatz 2 min auf 94°C erhitzt, um die Template-DNA zu denaturieren. Es folgten 25-30 Zyklen nach folgendem Schema:

94°C 60 s (Denaturierung)

50-60°C 30 s (Primer Annealing)

72°C 60 s (DNA-Synthese)

Zuletzt folgte ein finaler Extensionsschritt bei 72°C für 7 Minuten.

Das PCR-Programm wurde der Schmelztemperatur der verwendeten Primer entsprechend variiert. 10 μ l des Reaktionsansatzes wurden nach Ablauf der PCR über Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Alle zur Klonierung eingesetzten PCR-Produkte wurden überdies sequenziert, um auszuschließen, dass durch die PCR unerwünschte Mutationen eingeführt wurden.

2.2.12 Reinigung von PCR-Produkten mit dem QIAquick PCR-Purification Kit

PCR-Produkte, die zur Klonierung vorgesehen waren, wurden mit dem QIAquick PCR-Purification Kit der Firma Qiagen gereinigt, um noch vorhandene dNTPs, Primer und DNA-Polymerase aus dem Reaktionsansatz zu entfernen, bevor ein Restriktionsverdau durchgeführt wurde. Die Methode basiert auf der Salz- und pH-Abhängigkeit der Bindung von DNA an eine Silica-Gel Membran.

Zu 100 μ l Reaktionsansatz aus der PCR wurden 500 μ l Puffer PB zugegeben und gemischt. Die Mineralölschicht über dem Reaktionsansatz musste dazu nicht entfernt werden. Dieser Ansatz wurde auf eine "QIAquick Spin" Säule aufgegeben, welche in einem 2 ml Sammelgefäß eingesetzt war. Um die DNA zu binden wurde 1 min bei 13000 Upm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Säulendurchlauf wurde verworfen, 0,75 ml Puffer PE (Waschpuffer) zugegeben und wie zuvor zentrifugiert, um Verunreinigungen zu entfernen. Erneut wurde der Durchlauf verworfen und nochmals für 1 min bei 13000 Upm zentrifugiert um Reste des Waschpuffers zu entfernen. Zur Elution der DNA wurde die Säule in ein steriles 1,5 ml Eppendorfgefäß eingesetzt und 30 μ l 10 mM Tris-HCl pH 8,5 auf die Mitte der Säulenmembran pipettiert, für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wie oben zentrifugiert. Ein Aliquot des Eluats wurde über Agarosegelelektrophorese analysiert.

2.2.13 Ortsspezifische Mutagenese von Plasmid-DNA

Zur ortsspezifischen Mutagenese von DNA wurde das "Quikchange site directed mutagenesis Kit" der Firma Stratagene (Heidelberg) verwendet.

Die Methode erlaubt das Einfügen von Punktmutationen in doppelsträngige Plasmid-DNA, die das zu untersuchende Gen trägt. Dies geschieht mit Hilfe von zwei zueinander komplementären synthetischen Oligonukleotiden, welche die gewünschte Mutation enthalten. Es wird eine "Round Circle PCR" mittels Pfu-Polymerase durchgeführt, bei der das komplette Plasmid repliziert wird. Die Pfu-Polymerase synthetisiert DNA-Stränge mit höherer Genauigkeit als Taq-Polymerase, ist aber nicht in der Lage, die Mutationsoligonukleotide vom Gegenstrang zu verdrängen, also bricht die Synthese nach einem Umlauf um das Plasmid ab. Dadurch entsteht beim Einbau und der Extension der Oligonukleotid Primer ein mutiertes Plasmid, das versetzte Einzelstrangbrüche (sogenannte "staggered nicks") enthält. Nach der PCR werden die Reaktionsprodukte mit der Restriktionsendonuklease DpnI behandelt. Dieses Enzym besitzt die Erkennungssequenz 5'-G^{m6}ATC-3' und ist spezifisch für methylierte und hemimethylierte DNA. Dadurch wird die parentale Template DNA verdaut und auf die nichtmethylierte neusynthetisierte mutierte DNA selektioniert. Diese DNA wird anschließend in E. coli transformiert (Epicurian Coli® XL1-Blue superkompetente Zellen), wo die durch PCR eingeführten Einzelstrangbrüche repariert werden und das mutierte Plasmid propagiert werden kann.

Für die Mutagenese wurden in einem PCR-Reaktionsgefäß 5µl 10x Reaktionspuffer (100 mM KCl, 60 mM (NH₄)₂SO₄, 200 mM Tris-HCl (pH8,0), 20 mM MgCl₂, 1 % Triton X-100, 100 µg/ml BSA), 5-50ng Template-DNA, je 125ng Oligonukleotid Primer #1 und #2, 1µl 10mM dNTP-Mix gemischt, mit sterilem ddH₂O auf 50µl aufgefüllt und zuletzt 1µl *Pfu*-Polymerase (2,5 U/µl) zugegeben.

Die Parameter für die anschließende PCR waren wie folgt:

Segment	Zyklen	Temperatur	Dauer
1	1	95°C	30 s
2	12-18	95°C	30s
		55°C	1 min
		68°C	2 min/kb Plasmidgröße

Die Zahl der Zyklen in Segment 2 variiert abhängig von der gewünschten Mutation: Für Punktmutationen werden 12, für Austausch einzelner Aminosäuren 16, für Deletion oder Insertion mehrerer Aminosäuren 18 Zyklen benötigt.

Nach Beendigung der PCR wurde die Reaktion für den anschließenden *Dpn*I-Verdau 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Danach wurde 1µl *Dpn*I (10 U/µl) zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert, um die nichtmutierte parentale DNA zu verdauen. Für die Transformation in Epicurian Coli® XL1-Blue ultrakompetente Zellen wurde in einem 15 ml Falcon 2059 Polypropylen-Röhrchen 1 µl des *Dpn*I behandelten PCR-Produktes zu 50µl der kompetenten Bakterien zugegeben. Weiterhin wurde verfahren wie beschrieben (2.2.6), jedoch wurde 45 s bei 42°C inkubiert und statt 0,9 ml LB-Medium 0,5 ml NZY+ Medium zugegeben.

Am folgenden Tag wurden 10 Einzelkolonien gepickt, von denen eine Plasmidpräparation zur anschließenden Sequenzierung durchgeführt wurde.

2.2.14 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde im Cycle-Sequencing-Verfahren mit einem ABI 373A DNA Sequencer von Herrn Andreas Hunziker, Abteilung Zellbiologie im DKFZ durchgeführt. Für die Sequenzreaktion wurde das ABI PRISM[™] Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit mit AmpliTaq® DNA Polymerase, FS verwendet. Die Sequenzanalyse erfolgt dabei mit dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger (Sanger et al., 1977). Bei diesem Verfahren wird die von einem Primer ausgehende DNA-Synthese beim Einbau eines Didesoxynukleotids (ddNTP) abgebrochen, da diesem das zur Kettenverlängerung nötige 3' OH fehlt. Somit entspricht die Länge des synthetisierten Stranges der Einbauposition des Didesoxynukleotids. Die ddNTPs sind dem Reaktionsgemisch in einer Konzentration beigefügt, die mit statistischer Häufigkeit zum Abbruch an allen möglichen Positionen führt, wodurch also jede mögliche Kettenlänge (in einem Bereich von 10- >700 Basen) vertreten ist. Dieses Gemisch unterschiedlich langer DNA-Stränge wird in einem Polyacrylamid/Harnstoff-Gel zur Sequenzanalyse aufgetrennt. Die verwendeten ddNTPs sind an unterschiedlich Farbstoffe gekoppelt, welche nach Anregung mit Laserstrahlen Licht definierter Wellenlänge emittieren, das im Sequencer detektiert wird. Dies erlaubt die Verwendung aller vier ddNTPs zugleich in einer Reaktion. Zudem werden so nur spezifische, durch ddNTP-Einbau hervorgerufene Abbrüche erkannt, da ein unmarkiertes dNTP am 3'-Ende des Stranges kein Fluoreszenzsignal hervorruft.

Die Sequenzierungsreaktion wurde wie folgt durchgeführt: Zu 8 μ l Terminator Ready Reaction Mix (A-Dye Terminator, C-Dye Terminator, G-Dye Terminator, T-Dye Terminator, dATP, dCTP, dITP, dTTP Tris-HCl (pH 9,0), MgCl₂, hitzestabile Pyrophosphatase, AmpliTaq DNA Polymerase FS) wurden 0,5 μ g Plasmid-DNA und 1 μ l Sequenzierungsprimer (3,2 pmol/ μ l) zugegeben , mit sterilem, deionisiertem Wasser auf 20 μ l aufgefüllt und folgende Cycle Sequencing Reaktion durchgeführt:

<u>25 Zyklen</u> :				
96°C	10 Sekunden	(Denaturieren)		
50°C	5 Sekunden	(Annealing)		
60°C	4 Minuten	(Synthese)		

Nach Beendigung der Reaktion wurde der Reaktionsansatz mit Ethanol gefällt (2.2.9), um nicht eingebaute farbstoffmarkierte ddNTPs zu entfernen, die die Sequenzanalyse stören würden. Bis zur Sequenzierung wurde die gefällte DNA bei -20°C gelagert. Vor der Auftragung wurden die Proben in 5µl Ladepuffer (50mM EDTA mit 50 mg/ml Blue Dextran) resuspendiert und 2 min bei 90°C denaturiert.

2.2.15 Klonierungen

2.2.15.1 Klonierung von Cβ2 in pASK-IBA 6

Für die Klonierung in den Vektor pASK-IBA 6 wurde das Cβ2-Gen zunächst über eine PCR mit den Oligonukleotiden Cβ2-BsaI-FP und –RP aus dem pET28b/Cβ2 Konstrukt heraus-

amplifiziert. Dabei wurden sowohl 5' als auch 3' des CB2-Gens Bsal-Schnittstellen sowie einige zusätzliche vektorspezifische Basen eingefügt. Da Bsal außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, kann das gewünschte Gen so passgenau downstream des StreptagII eingefügt werden, ohne zusätzliche Aminosäuren einzuführen (Abbildung 3).

PCR mit Cβ2:





Abbildung 3: Strategie zur Klonierung von CB2 in pASK-IBA6

Die verwendeten Oligonukleotidprimer sind in kleinen Buchstaben dargestellt, die BsaI-Erkennungssequenz ist unterstrichen. Die für das StreptagII und die FaktorXa-Erkennungssequenz codierenden Basen sind kursiv bzw. in Fettdruck hervorgehoben

Sowohl das gereinigte PCR-Produkt als auch der Vektor wurden für 1 h bei 50°C mit 10 U Bsal pro µg DNA inkubiert. Als Verdunstungsschutz wurde der Ansatz mit Paraffinöl überschichtet. Nach der Restriktion wurden die gewünschten Fragmente über eine präparative Gelelektrophorese gereinigt und über Nacht bei 14°C ligiert.

Nach Transformation in *E. coli* XL-1 Blue wurde über Plasmidminipräparation mit anschließender Restriktionsanalyse nach positiven Klonen gescreent und zwei unabhängige Klone durch Sequenzierung überprüft.

2.2.15.2 Klonierung von Cβ2 in pASK-IBA 7

Da die Expressionkassetten der pASK-IBA Vektoren austauschbar sind, konnte das Cβ2 Gen mit einem *Bsp119I/HindIII*-Restriktionsverdau aus pASK-IBA6 herausgeschnitten und in einen entsprechend verdauten pASK-IBA7 Vektor einligiert werden. Positive Klone wurden über einen geeigneten Restriktionsverdau identifiziert.

2.2.15.3 Klonierung von Cβ2 in pBlueBac4.5

Die Klonierung von Cβ2 in den Baculo-Transfervektor pBlueBac4.5 erfolgte über die *NheI* und *BamHI* Schnittstellen des Vektors. Da das Cβ2-Gen über eine interne *NheI*-Schnittstelle verfügt, wurde mit pASK-IBA6/Cβ2 als Template und den Primern Cβ2-XbaI und Bam-beta RP1 eine PCR durchgeführt. *XbaI*- und *NheI*-geschnittene DNA besitzt kompatible überhängende Enden, so dass auf diesem Weg das *XbaI/BamHI* verdaute PCR-Produkt in den *NheI/XbaI* geschnittenen Vektor ligiert werden konnte.

Nach Transformation in *E. coli* XL1-Blue wurden Klone, die das gewünschte Insert trugen, über Plasmidpräparation gefolgt von einem Restriktionsverdau identifiziert und mittels Sequenzierung verifiziert.

2.2.15.4 Klonierung von Cβ1 in pET28b(+)

Die C β 1-cDNA lag im eukaryotischen Expressionsvektor pSG5 vor. Um eine Klonierung in pET28b(+) zu ermöglichen, wurde eine PCR mit pSG5/C β 1 als Template und den Oligonukleotidprimern C β 1-NdeI und Bam-beta RP1 durchgeführt. Das gereinigte PCR-Produkt und der pET28b(+)-Vektor wurden mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *BamHI* gespalten, die gewünschten Fragmente mit präparativer Agarosegelelektrophorese gereinigt und anschließend für 2 h bei Raumtemperatur ligiert. Die Identifizierung positiver Klone erfolgte wie unter 2.2.15.1 beschrieben.

2.3 Zellkultur

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Sf9 Insektenzellen zur rekombinanten Expression der katalytischen Untereinheit Cβ2 der Proteinkinase A verwendet. Bei diesen Zellen handelt es sich um klonale Isolate der Zelllinie IPLB SF21-AE, die aus dem ovarialen Gewebe des Nachtfalters *Spodoptera frugiperda* etabliert wurde (Vaughn et al., 1977).

2.3.1 Adhärente Sf9-Kultur:

Zur Dauerkultur wurden die Sf9-Zellen als Monolayer-Zellen in 75 cm² Gewebekulturflaschen in einem Wärmeschrank steril bei 27°C in 20 ml *Trichoplusia ni* Medium – Formulation Hink (TNM-FH) mit 10 % fötalem Kälberserum und 10 µg/ml Gentamycin (im folgenden als TNM-FH Komplettmedium bezeichnet) gehalten. Zur Passagierung von konfluenten Zellen (alle 2-3 Tage) wurde das Medium bis auf 5 ml abgesaugt und die Zellen entweder durch Darüberströmen des Mediums mit einer Pipette oder vorsichtiges Abschaben mit einem Zellschaber vom Flaschenboden gelöst. Zellzahl und Viabilität der Zellen wurde in einer Neubauer-Zählkammer kontrolliert. Aliquots der Zellsuspension wurden 1:3-1:4 in frischem Medium verdünnt (auf 2,5-5 × 10⁶ Zellen) und in frische Gewebekulturflaschen überführt.

Um konstantes Zellmaterial zu gewährleisten, wurden alle 3 Monate in flüssigem Stickstoff gelagerte Zellen aufgetaut.

2.3.2 Sf9-Suspensionskultur:

Die Suspensionskultur wurde für die rekombinante Expression verwendet, da so eine höhere Zellzahl und –dichte zu erreichen ist. Zu diesem Zweck wurden Sf9-Zellen aus adhärenter Kultur in einer Zelldichte von 10^6 Zellen/ml in einer Spinnerflasche ausgesät und bei 80-100 Upm und 27°C gehalten. Bei Erreichen einer Zelldichte von 2,5-3 × 10^6 Zellen/ml wurde die Kultur auf 0,7-1 × 10^6 Zellen/ml verdünnt, um die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase zu halten. Um ausreichende Belüftung zu gewährleisten, wurde die Spinnerflasche nur bis zur Hälfte des nominellen Volumens gefüllt.

2.3.3 Einfrieren der Zellen

Zur Langzeitlagerung wurden adhärente Sf9 Zellen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden und 80-90% konfluent waren, nach möglichst geringer Zahl von Passagen eingefroren. Dazu wurden die Zellen aus mehreren Gewebekulturflaschen vom Boden gelöst, im Medium resuspendiert und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 500×g für 10 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Kulturüberstand wurde verworfen und das Zellpellet in 60% Grace's Medium, 30% FKS und 10% DMSO auf eine Zelldichte von 10⁷ Zellen/ml resuspendiert. 1 ml Aliquots wurden in auf Eis vorgekühlte Kryoröhrchen überführt und diese mindestens 1 h bei –20°C und anschließend 24-48 Stunden bei –80°C gelagert, bevor sie in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden.

2.4 Rekombinante Expression von Proteinen

2.4.1 Bakterielle Expression mit dem pET-System

Für die heterologe Expression der katalytischen Untereinheiten in *E. coli* wurde das pET-System verwendet, welches die Expression heterologer Proteine mit der authentischen Aminosäuresequenz erlaubt, d.h. ohne Fusionen mit bakteriellen Proteinen oder artifiziellen Sequenzen (wie z.B. His₆-tags). Dazu wurden die Expressionsvektoren pT7-7/C α , pET28b/C β 1 bzw. pET28/C β 2 in den *E. coli* Expressionsstamm BL21(DE3) transformiert. Dieser *E. coli*-Stamm trägt eine chromosomale Kopie des T7 RNA-Polymerase-Gens, das unter der Kontrolle eines *lac*-Operators steht und somit durch IPTG induzierbar ist. Die induzierte T7-Polymerase transkribiert spezifisch das in den Expressionsvektor (pT7-7 oder pET28b) klonierte Gen, welches von einem T7-Promoter kontrolliert wird (Studier und Moffat, 1986; Studier et al., 1990).

Testexpressionen im kleinen Maßstab:

Eine Einzelkolonie von einer Selektionsplatte mit frischen Transformanden wurde in ein Reagenzröhrchen mit 5 ml LB-Medium mit Antibiotikum (Carbenicillin bei pT7-7, Kanamycin bei pET28) überimpft und über Nacht unter starkem Schütteln bei 37°C inkubiert. Aus dieser Kultur wurden am folgenden Tag mehrere frische 5 ml Kulturen angeimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 bei 37°C geschüttelt. Zu diesem Zeitpunkt wurden die einzelnen Kulturen mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen induziert, während eine Kultur als Negativkontrolle uninduziert blieb. Nach weiteren 2-3 h im Schüttelinkubator bei 37°C wurden die Kulturen abzentrifugiert, der Kulturüberstand verworfen, das Bakterienpellet je nach Größe in 50-100 µl 1×SDS-Probenpuffer resuspendiert und die Bakterien durch 5 minütiges Erhitzen auf 95°C aufgeschlossen. Aliquots der Proben wurden über SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung oder Western-Blot analysiert.

Die Inkubationstemperatur der induzierten Kulturen wurde zur Optimierung der Expression ebenfalls variiert.

Expressionen im großen Maßstab:

Für Expressionen zur Proteinaufreinigung wurden, je nach gewünschter Proteinmenge, 2-8 Schikanekolben mit 1 1 antibiotikahaltigem LB-Medium 1:100 aus einer ÜN-Vorkultur beimpft. Die Kulturen wurden bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,3-0,4 bei 30°C und 140 Upm geschüttelt. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Inkubationstemperatur auf 24°C abgesenkt. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 wurden die Kulturen mit der in den Testexpressionen optimierten IPTG-Konzentration (im allgemeinen 0,5 mM) induziert und über Nacht bei 24°C weitergeschüttelt. Am folgenden Tag wurden die Kulturen zur Proteinpräparation geerntet.

2.4.2 Bakterielle Expression mit dem Strep-tag System

Beim *Strep*-tag System handelt es sich um ein prokaryotisches Expressionssystem, welches das klonierte Gen als Fusionsprotein mit dem 8 AS großen *Strep*-tag II Peptid (WSHPQFEK; Schmidt et al., 1996) exprimiert, was für die anschließende Affinitätsreinigung genutzt wird. Zusätzlich bietet es die Möglichkeit, das rekombinante Protein mittels der bakteriellen OmpA-Signalsequenz ins Periplasma zu leiten. Die Genexpression wird dabei durch die Promoter/Operatorregion des *tet*A-Resistenzgens gesteuert, sie kann durch antibiotisch unwirksame Konzentrationen von Anhydrotetracylin (AHT) induziert werden (Skerra, 1994). Da der *tet*A Promoter/Operator keinen weiteren zellulären Regulationsmechanismen unterliegt, kann die Expression in beliebigen *E. coli* Stämmen durchgeführt werden (Skerra, 1994). Expressionsstudien wurden mit den Stämmen XL1-Blue und BL21(DE3) durchgeführt.

Testexpressionen im kleinen Maßstab wurden analog zum pET-Expressionssystem durchgeführt (2.4.1), die Bakterienanzucht und Genexpression erfolgte jedoch auf Empfehlung des Herstellers bei 30°C. Die Induktion der Genexpression erfolgte bei Erreichen

einer OD_{600} von 0,5-0,6 mit 0,2 µg/ml AHT. Die Analyse der Expression erfolgte wie oben beschrieben.

Für Expressionen im größeren Maßstab wurden 100 ml LB-Medium mit 50 μ g/ml Carbenicillin 1:50 aus einer Vorkultur frischer Transformanden beimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 30°C geschüttelt. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Induktion der Genexpression durch Zugabe von 200 μ g/l AHT. Nach weiteren 3-4 h wurden die Zellen zur Proteinaufreinigung geerntet.

2.4.3 Rekombinante Expression in Sf9-Insektenzellen mit dem Baculovirus Expressionssystem

Rekombinante Baculoviren können als Vektoren dienen, um heterologe Gene in Insektenzellen rekombinant zu exprimieren. Aufgrund ihrer engen Wirtsspezifität und der Nichtinfektivität für Vertebratenzellen sind Baculoviren besonders gut zu diesem Zweck geeignet. Das Genom des *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus (AcNPV) besteht aus einem zirkulär geschlossenen DNA-Strang von ca. 130 kB. Bei rekombinanten Virionen steht das heterologe Gen unter der Kontrolle des Polyhedrin (PH) Promoters, der für die Genexpression in der späten Phase einer Infektion der Wirtszelle verantwortlich ist. Da es sich um eukaryotische Zellen handelt, wird dabei eine Vielzahl von posttranslationalen Modifikationen, wie z.B. Phosphorylierungen, Acylierungen oder Glykosylierungen korrekt durchgeführt (Lanford ,1988; Piwnica-Worms et al., 1990; Herrera et al., 1988; Lanford et al, 1989).

Erzeugung rekombinanter Baculoviren:

Um rekombinante Baculoviren zu erhalten, wurde das pBlueBac4.5/Cβ2 Plasmid mit Bac-N-Blue[™] DNA (Invitrogen) in Sf9-Zellen kotransfiziert. Bei der Bac-N-Blue[™] DNA handelt es sich um lineare virale DNA, welche eine letale Deletion besitzt, die nur durch homologe Rekombination mit dem Transfer-Vektor pBlueBac4.5 komplementiert werden kann. Durch diesen Rekombinationsvorgang integriert das in den pBlueBac4.5 Vektor klonierte Gen in das Virus-Genom. Zugleich entsteht eine funktionsfähige Kopie des lacZ-Gens, was die Identifizierung rekombinanter Viren im Plaque-Assay über eine Farbreaktion ermöglicht (2.4.3.2).

2.4.3.1 Transfektion von Sf9 Zellen mit kationischen Liposomen

Für die Kotransfektion von pBlueBac4.5/C β 2 und Bac-N-BlueTM-DNA wurden 2×10⁶ Sf9 Zellen, die sich in logarithmischem Wachstum befanden, in TNM-FH Komplettmedium in einer 60 mm Zellkulturschale ausgesät. In ein 1,5 ml Eppendorfgefäß wurden 10 µl (0,5 µg) Bac-N-BlueTM DNA, 4 µg pBlueBac4.5/C β 2, 1 ml Grace's Insect Medium (ohne FKS!) und zuletzt 20 µl InsectinPlusTM Liposomen gegeben, 10 s gevortext und anschließend 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei bilden sich positiv geladene Liposomen-DNA Komplexe, die sich an die negativ geladene Plasmamembran anlagern und mit ihr fusionieren können.

Nachdem sich die Sf9-Zellen an den Schalenboden angeheftet hatten, wurde das gesamte Medium vorsichtig entfernt und die Zellen mit 2 ml Grace's Medium gewaschen, um Reste von Serum zu entfernen. Das Medium wurde erneut vollständig abgesaugt und die Transfektions-Mixtur tropfenweise auf das Zell-Monolayer gegeben, wobei auf eine gleichmäßige Verteilung geachtet wurde. Anschließend wurden die Zellen für 4 h bei Raumtemperatur auf einer Schüttelplattform bei niedrigster Geschwindigkeit inkubiert. Nach der vierstündigen Inkubation wurde 1 ml TNM-FH Komplettmedium zugegeben und die Schalen für 72 h bei 27°C inkubiert. Die Zellkulturschalen wurden mit Parafilm umwickelt, um Verdunstung zu verhindern.

Nach 72 Stunden wurden 2 ml Medium von den transfizierten Zellen geerntet und lichtgeschützt bei 4°C gelagert. Dieser Transfektions-Virusstock enthält bei erfolgreicher homologer Rekombination von Transferplasmid und viraler DNA die von den Zellen abgegebenen Viruspartikel. Die transfizierten Zellen wurden nach Zugabe von 3 ml TNM-FH Komplettmedium weiter bei bei 27°C inkubiert und täglich visuell auf Zeichen einer viralen Infektion überprüft.

Nach 5-7 Tagen wurden die Zellen im Medium resuspendiert und in einem 15 ml Falcon-Röhrchen bei 1000×g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 μ l PBS + 0,1% Triton X-100 aufgenommen, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, gevortext und 30 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde durch Zentrifugation bei 13000 Upm in einer Tischzentrifuge in lösliche und partikuläre Fraktion getrennt. Die partikuläre Fraktion wurde in 100 μ l 1× SDS-Probenpuffer aufgenommen. Aliquots von löslicher und unlöslicher Fraktion wurden einer Analyse durch SDS-PAGE und Western-Blot unterzogen.

PBS: 137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 8,1 mM Na₂HCO₃, 1,47 mM KH₂PO₄

2.4.3.2 Plaque-Assay

Der Plaque-Assay dient dazu, reine rekombinante Viren aus dem Transfektions-Virusstock zu isolieren. Dies ist notwendig, da die zur Transfektion verwendete Bac-N-Blue[™] Virus-DNA auch einen sehr geringen Anteil an Wildtyp Virus-DNA enthält, die jedoch mit sehr viel höherer Effizienz transfiziert wird und so zur Infektion mit Wildtyp-Baculoviren führt, welche die rekombinanten Viren auf Dauer ausverdünnen würden. Bei einem Plaque Assay werden Sf9 Zellen mit verdünnten Viren infiziert, so dass möglichst einzelne Zellen nur von einem einzelnen Virion infiziert werden. Eine Überschichtung der Zellen mit Agarose stellt dann sicher, dass die von der befallenen Zelle bei der Lyse freigesetzten Viren nur Zellen in der unmittelbaren Nachbarschaft infizieren können. Durch den Zyklus von Zelllyse und Neuinfektion bildet sich so ein Loch (Plaque) im Zellmonolayer aus, das sich bei rekombinanten Viren leicht durch die Umsetzung des chromogenen Substrates Bluo-gal identifizieren lässt.

Für jede zu testende Virusverdünnung $(10^{-2}-10^{-4})$ wurden fünf 100 mm Zellkulturschalen mit 5×10^{6} Sf9 Zellen in 5 ml TNM-FH Komplettmedium angesetzt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Zellen ein gleichmäßig verteiltes Monolayer bilden und etwa 50% konfluent sind. Aus dem Transfektions-Virusstock wurden serielle Verdünnungen $(10^{-2}-10^{-4})$ in TNM-FH Komplettmedium angesetzt. Von den Zellkulturschalen für eine zu testende Verdünnung wurde das Medium bis auf 2 ml abgenommen und 1 ml der entsprechenden Virusverdünnung tropfenweise zugegeben. Anschließend wurden die Schalen für 1 h auf einer Schüttelplattform bei der niedrigsten Geschwindigkeit inkubiert. Diese Schritte wurden für die übrigen Verdünnungen zeitlich gestaffelt wiederholt.

Währenddessen wurde die Agarose zur nachfolgenden Überschichtung der infizierten Zellen vorbereitet. Dazu wurden 50 ml 2,5% Baculo-Agarose in sterilem H₂O_{bidest} mit 50 ml TNM-FH Komplettmedium gemischt und in einem 47°C Wasserbad aufbewahrt.

Nach Ablauf der einstündigen Inkubation wurde das virushaltige Medium vollständig von den Zellen abgesaugt. 5 ml der vorgewärmten Agarose-Medium Mischung wurden in einem 15 ml Greiner Röhrchen mit 5 ml TNM-FH Komplettmedium + 150 μ g/ml Bluo-gal (5-bromo-indolyl- β -D-Galaktosidase) durch Auf- und Abpipettieren gemischt und das Zellmonolayer vorsichtig damit überschichtet. Dieser Vorgang wurde nach Virusverdünnungen gestaffelt für alle Ansätze wiederholt.

Nach dem Aushärten der Agarose wurden die Zellkulturschalen in Gefrierboxen gestellt, die mit in 5 mm EDTA getränktem Filterpapier (zur Verhinderung von Pilz und

Bakterienwachstum) ausgelegt waren. Anschließend wurden die Zellen für mindestens 5 Tage bei 27°C inkubiert und täglich visuell auf das Auftreten von Plaques hin untersucht.

Bluo-gal Lösung:

100 mg Bluo-gal werden in 2 ml Dimethylformamid gelöst und lichtgeschützt bei -20°C gelagert

2,5% Agarose:

1,25 g Baculo-Agarose werden in einer 125 ml Flasche in 50 ml H₂O_{bidest} durch Aufkochen in einem Mikrowellenherd gelöst und sterilisiert.

2.4.3.3 Amplifikation rekombinanter Viren

Nach der Identifizierung rekombinanter Viren im Plaque-Assay ist es nötig, diese zu vermehren, um den sogenannten P-1 Virusstock zu gewinnen, der als Grundlage für einen in der Expression verwendbaren "High Titer Stock" (HTS) dient.

In die einzelnen Vertiefungen einer 12-well Mikrotiterplatte wurden 5×10⁵ logarithmisch wachsende Sf9-Zellen in 2-3 ml TNM-FH Komplettmedium ausgesät. Aus den Zellkulturschalen des vorangegangenen Plaque-Assays wurden 10 einzelne blaugefärbte Plaques mit einer Pasteur-Pipette ausgestochen und in die Wells der Mikrotiterplatte überführt. Außerdem wurde eine der Wells mit einem Plaque beimpft, der Anzeichen einer Wildtyp-Virusinfektion zeigte, während die letzte Vertiefung als Negativkontrolle diente. Zuletzt wurde die Mikrotiterplatte mit Parafilm umwickelt und bei 27°C inkubiert.

Nach drei Tagen wurden die infizierten Zellen im Medium resuspendiert und 0,75 ml der Suspension entnommen. Aus dieser Probe wurde virale DNA isoliert (2.2.8) die anschließend über eine PCR auf die korrekte Integration des Cβ2-Gens hin untersucht wurde (s.u.). Die Mikrotiterplatte mit den restlichen Zellen wurde weitere 5-7 Tage bei 27°C inkubiert, bis die Zellen lysierten. Zu diesem Zeitpunkt wurde das virushaltige Medium geerntet und als P-1 Virusstock lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

PCR-Analyse der rekombinanten Viren:

In einem PCR Reaktionsgefäß wurden 5 μ l virale DNA, 5 μ l 10 × PCR Puffer, 1 μ l 25 mM dNTPs (0,5 mM final), 1 μ l Bac-Fwd (-44) Primer, 1 μ l Bac-Rev (+778) Primer (je 100 ng) und 1,5 U *Taq* DNA-Polymerase zusammenpipettiert, mit sterilem H₂O_{bidest} auf 50 μ l

Segment	Zyklen	Temperatur	Dauer
1	1	94°C	2 min
2	30	94°C	1 min
		55°C	2 min
		72°C	3 min
3	1	72°C	7 min

aufgefüllt und mit 30 µl Mineralöl überschichtet. Die Amplifikation wurde mit folgendem PCR-Programm durchgeführt:

10 µl der PCR-Reaktion wurden anschließend in einem 1 % Agarosegel analysiert.

Amplifikation des P-1 Virusstocks

Zur Durchführung von Expressionsstudien ist es nötig, aus dem P-1 Virusstock, der einen unbekannten niedrigen Virentiter hat, einen Virusstock hohen, bekannten Titers zu erzeugen.

Es wurden zwei 25 cm² Zellkulturflaschen mit 2 × 10⁶ Sf9 Zellen in 5 ml TNM-FH Komplettmedium angesetzt. Dazu wurden 20 µl des P-1 Virusstocks gegeben und die Zellen für mindestens 7 Tage bei 27 °C inkubiert, bis sie vollständig lysierten. Daraufhin wurde das Medium mit den lysierten Zellen abgesaugt. Von diesem P-2 Virusstock wurde ein 1 ml Aliquot bei –80°C gelagert, weitere 4 ml wurden lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt. Mit den verbleibenden 5 ml des P2-Stocks wurde eine 500 ml Suspensionskultur von Sf9 Zellen mit einer Zelldichte von ca. 2 × 10⁶ Zellen/ml infiziert und für 10 Tage bei 27°C inkubiert. Anschließend wurden die größtenteils lysierten Zellen für 20 min bei 1000×g abzentrifugiert und der Kulturüberstand (=P-3 Virusstock) in eine sterile Flasche überführt. Der virale Titer wurde mittels eines Plaque-Assays (s.o.) bestimmt, bei dem Virusverdünnungen von 10⁻⁵-10⁻⁷ eingesetzt wurden. Bei den Schalen der Verdünnung, die eine gut auszählbare Zahl von Plaques ergab (zwischen 10 und 100) wurde die Zahl der Plaques pro Schale gemittelt und mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert; dies ergibt den Virustiter in *pfu/ml* (plaque forming units/ml).

Material und Methoden

2.4.3.4 Optimierung der Expression

Um die rekombinante Expression des Cβ2 Gens zu optimieren, wurden die MOI (Multiplicity of infection) und die Dauer der Expression variiert. Die MOI gibt das Verhältnis rekombinanter Viren zu Sf9 Zellen am Zeitpunkt der Infektion an.

Für jede zu testende MOI wurde eine 6-Well Platte mit 10^6 Sf9 Zellen in 1 ml TMN-FH Komplettmedium pro Well angesetzt. Fünf Wells (für verschiedene Zeitwerte) wurden mit Viren aus dem P-3 Stock in der gewünschten MOI infiziert, während die letzte Kultur als Negativkontrolle uninfiziert blieb. Die Zellen wurden bei 27°C inkubiert, wobei im Abstand von je 24 Stunden die infizierten Zellen eines Wells im Medium resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt wurden. Die uninfizierte Kontrolle wurde nach 48 Stunden geerntet. Die Zellen wurden anschließend für 10 min bei 800 × g und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und ebenso wie das Zellpellet bis zur Weiterverarbeitung bei –80°C gelagert.

Nachdem alle Proben entnommen waren, wurden die Zellpellets in 100 μ l PBS + 0,1% Triton X-100 resuspendiert, gevortext und 30 min auf Eis inkubiert. Das Zelllysat wurde bei 13000 Upm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Gefäß überführt. Das Pellet mit der unlöslichen Fraktion wurde in 100 μ l 1× SDS Probenpuffer resuspendiert. Die Analyse der Proben erfolgte über SDS-PAGE und Immunoblot.

2.4.3.5 Rekombinante Expression im großen Maßstab

Adhärente Zellkultur:

Für die Expression mit adhärenten Sf9-Zellen wurden 8-12 175 cm² Zellkulturflaschen mit ca. 2×10^7 Zellen in 30 ml TNM-FH Komplettmedium beimpft und aus dem P-3 Virusstock mit der zuvor optimierten MOI infiziert. Nach 72stündiger Inkubation bei 27°C wurden die Zellen im Medium resuspendiert in ein steriles Zentrifugationsgefäß überführt und bei 800 × g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit dem Zellpellet weiterverfahren wie unter 2.5.6 beschrieben.

Suspensionskultur:

Für die Expression mit Suspensionszellen wurde eine 500 ml Kultur mit einer Zelldichte von etwa 2×10^6 Zellen/ml angesetzt. Die Zellen wurden aus dem P-3 Virusstock mit der optimierten MOI infiziert und bei 27°C und 100 Upm inkubiert. Nach 72 h wurden die Zellen

42

wie oben beschrieben geerntet und mit der Proteinreinigung über PKI(5-24)-Affinitätschromatographie fortgefahren.

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 Gewinnung von Zellextrakten

2.5.1.1 Lyse von Bakterienzellen

Die *E. coli* Zellen wurden bei 4000 × g und 4°C abzentrifugiert und in 1/100 des ursprünglichen Kulturvolumens in Lysepuffer (30 mM MES pH 6,5, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT + CompleteTM Proteaseinhibitoren) resuspendiert. Die Zellen wurden mit Ultraschall aufgeschlossen (5 × 30 Pulse, 50 % Output, 70 % Zyklen) und die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 20000 Upm und 4°C (Sorvall SS34 Rotor) sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und für die Affinitätschromatographie verwendet.

2.5.1.2 Lyse von Sf9-Zellen

Die Sf9 Zellen wurden bei 800 × g und 4°C abzentrifugiert und in 100 μ l PBS + CompleteTM Proteaseinhibitoren pro 10⁶ Zellen resuspendiert (höchstens aber 50 ml). Die Lyse erfolgte entweder durch Ultraschall oder durch Zugabe von 0,1 % Triton X-100 im Homogenisationspuffer. Im letzteren Fall wurde die Probe 30-45 min auf Eis inkubiert, wobei das Lysat mehrfach gevortext wurde. Die Trennung in lösliche und unlösliche Fraktion erfolgte wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben.

2.5.1.3 Lyse von CHO-Zellen

Konfluente CHO-Zellen in 10 cm Zellkulturschalen wurden nach dem Entfernen des Mediums zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen auf Eis in Homogenisationspuffer (10 mM HEPES pH 7,4, 50 mM NaF, 1mM EDTA, 1mM DTT + Proteaseinhibitorcocktail) von den Schalen abgeschabt. Die Zelllyse erfolgte durch Ultraschall, danach wurde der Zellextrakt für 5 min bei 13000 \times g abzentrifugiert. Der Überstand wurde zur PKI(5-24)-Affinitätschromatographie im Minibatchverfahren eingesetzt (siehe 2.5.8).

2.5.1.4 Herstellung von Rohextrakt aus Rinderherzgewebe

Zur Präparation nativer C-Untereinheiten der PKA wurde Rinderherzgewebe verwendet, das sich durch einen hohen Gehalt an Proteinkinase A Isoformen auszeichnet.

Das bei -80° C gelagerte Gewebe (50 -100 g) wurde grob in etwa 2 cm³ große Stücke zerteilt und mit einem Pürierstab in 2 ml eiskaltem TMN 50 Puffer (mit Proteaseinhibitoren) pro Gramm Gewebe auf Eis homogenisiert. Das Homogenat wurde für 20 min bei 15000 × g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Glaswolle und Mullbinden gefiltert und das Filtrat für die PKI(5-24) Affinitätschromatographie eingesetzt.

TMN 50 Puffer: 50 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 50 mM Tris pH 7,4

2.5.2 Proteinmengenbestimmung nach der Methode von Bradford

Die Methode beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie brilliant blue G-250 bei der Bindung an Proteine von 465 nm auf 595 nm. Daher ist die Zunahme der Absorption bei 595 nm ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. (Bradford, M.M., 1976).In einer 96 well Mikrotiterplatte wurden 5-20 μ l der zu messenden Probe mit 40 μ l Bradford Reagenz und H₂O_{bidest} ad 200 μ l durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Die Absorption bei 595 nm wurde in einem E/A Autoreader gegen eine Referenz, die nur Puffer enthielt, gemessen und die Proteinkonzentration durch Vergleich mit einer Eichgeraden, die mit bekannten Mengen von BSA erstellt wurde, ermittelt.

Bradford-Reagenz: 55%(v/v) H₃PO₄, 5%(v/v) Methanol, 0,05%(w/v) Coomassie brilliant blue G-250 (Lagerung lichtgeschützt bei 4°C)

2.5.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wird zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht eingesetzt. Grundlage ist dabei die Bindung des Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) an die Proteinmoleküle, was diesen eine einheitliche negative Ladung verleiht und Protein-Protein-Wechselwirkungen unterbindet. Bei der Elektrophorese wandern die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe im elektrischen Feld zur Anode. Die poröse Polyacrylamidmatrix des Gels hat dabei den Effekt eines Molekularsiebes und trennt so die SDS-Protein-Komplexe entsprechend ihres Molekulargewichts auf. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das diskontinuierliche Lämmli-System mit Tris-Glycin Puffern verwendet (Lämmli, U.K., 1970). Dabei werden in einem großporigen Sammelgel (3-5%) mit leicht saurem pH alle Proteine in einem scharf abgegrenzten Bereich gesammelt, bevor sie im höherprozentigen (7-15%) leicht basischen Trenngel nach Molekulargewicht aufgetrennt werden.

Die 7×8 cm großen Gele wurden zwischen zwei Glasplatten mit 0,75 oder 1 mm dicken Spacern gegossen. Das Trenngel wurde nach dem Gießen mit Isopropanol überschichtet, um eine gerade Kante zu formen. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet. Zur Ausformung von Probentaschen wurden 10- oder 15-well Kämme in das frisch gegossenen Sammelgel eingesetzt.

Die zu analysierenden Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/5 Volumen 5 \times SDS-Probenpuffer versetzt und durch 3minütiges Erhitzen auf 95°C denaturiert und anschließend kurz abzentrifugiert. Die Elektrophorese wurde in einer mit Laufpuffer gefüllten Mini-PROTEAN II Elektrophoresekammer der Firma BioRad bei einer konstanten Spannung von 200 V und einer anfänglichen Stromstärke von 60 mA pro Gel durchgeführt.

	Trenngel 10%	Trenngel 11 %	Trenngel 12,5%	Sammelgel
H ₂ O _{bidest}	1,47 ml	1,14 ml	0,64 ml	6,05 ml
Acrylamid (30%, w/v) N,N-Bisacrylamid (0,8%, w/v)	3,33 ml	3,67 ml	4,17 ml	1,70 ml
0,625 M Tris pH 6,8	-	-	-	2,00 ml
0,75 M Tris-HCl pH 8,8	5,00 ml	5,00 ml	5,00 ml	-
20% SDS	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
10% APS	0,10 ml	0,10 ml	0,10 ml	0,10 ml
TEMED	0,004 ml	0,004 ml	0,004 ml	0,01 ml

Tabelle 1: Zusammensetzung diskontinuierlicher	Gele
--	------

5 × SDS-Probenpuffer: 250 mM Tris-HCl pH 6,8, 60% Glycerol, 20% SDS, 0,05% Serva Blau G, 200 mM DTT

Laufpuffer: 191,8 mM Glycin, 24,8 mM Tris-Base, 3,5 mM SDS

Für die Trennung von Proteinen kleinen Molekulargewichts wurde in Teilen dieser Arbeit das NuPAGE Bis-Tris Elektrophoresesystem (Invitrogen, Leek, NL) verwendet. Dabei handelt es sich ebenfalls um ein diskontinuierliches Gelsystem, das sich in den verwendeten Puffen von der traditionellen SDS-PAGE unterscheidet.

20 x MES SDS Laufpuffer für NuPAGE-Gele:

1 M MES, 1 M Tris Base, 69,3 mM SDS, 20,5 mM EDTA

4 x LDS Probenpuffer für NuPAGE-Gel:

40% Glycerol, 560 mM Tris Base, 420 mM Tris HCl, 290 mM LDS, 2 mM EDTA, 0,075% Serva Blau G250, 0,025% Phenolrot

2.5.4 Coomassie-Blau Färbung

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine durch Anfärben mit Coomassie Brilliant Blue R 250 nachgewiesen. Die Gele wurden für 30-45 min in Färbelösung (0,25 % Serva Blau R, 50 % Isopropanol, 10 % Eisessig) geschwenkt und anschließend zum Entfärben des Hintergrundes mehrere Stunden in 10 % Isopropanol, 15 % Eisessig inkubiert. Das entfärbte Gel wurde kurz gewässert und zur Dokumentation in einem Geltrockner bei 85°C auf ein Whatman-Filterpapier aufgetrocknet.

2.5.5 Western Blotting

Der als "Western Blot" bezeichnete Vorgang des Elektrotransfers von Proteinen aus einem Gel auf eine PVDF- oder Nitrocellulose-Membran, ermöglicht die Detektion auch geringer Mengen von Proteinen mit spezifischen Antikörpern.

2.5.5.1 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membran

Der Proteintransfer vom SDS-Polyacrylamidgel auf die PVDF-Membran erfolgte im Semi-Dry Verfahren mit einer Trans-Blot SD Zelle der Firma BioRad. Drei auf die Größe des Geles zurechtgeschnittene in Transferpuffer getränkte Whatman 3MM Filterpapiere wurden auf die Anodenplatte des Gerätes platziert. Darauf wurde die zuvor in Methanol angefeuchtete und in Transferpuffer äquilibrierte PVDF-Membran aufgelegt, es folgte das SDS-Polyacrylamidgel und zuletzt drei weitere Whatman 3 MM Filterpapiere. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Spannung von 15 V für 30-45 min, abhängig von der Größe der zu detektierenden Proteine.

Transfer-Puffer: 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 20 % Methanol

2.5.5.2 Proteinfärbung auf PVDF-Membranen

Um die Transfereffizienz zu überprüfen, wurden die Proteine auf der Membran mit Amidoschwarz-Färbung nachgewiesen und die Membran fotografiert. Dazu wurde die Membran 1-2 Minuten in einer 0,01% (w/v) Amidoschwarz-Lösung in 40 % Methanol / 10 % Essigsäure geschwenkt und anschließend mit H_2O_{bidest} entfärbt.

2.5.5.3 Antikörpernachweis (Immundetektion)

Zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen auf der Membran wurde diese 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in 2 % (w/v) BSA in PBS-T (0,05 % Tween-20 in PBS) geschwenkt. Der gegen das gesuchte Protein gerichtete Antikörper bzw. das Antiserum wurde in geeigneter Verdünnung in PBS-T 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit der Membran inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3 × 10 min mit PBS-T gewaschen und anschließend für 1 h mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (in PBS-T) inkubiert. Zuletzt folgte nochmaliges Waschen der Membran mit PBS-T für 3 × 10 min.

Der Nachweis erfolgte mit dem *Renaissance* Enhanced Chemiluminescence Detection Kit (NEN Life Science). Dazu wurde die Membran 1 min im Detektionsreagenz inkubiert. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase oxidiert Luminol in Gegenwart von H_2O_2 und Verstärkern (Phenolen). Das Luminol wird dadurch in einen angeregten Zustand überführt, der unter Lichtemission wieder in den Grundzustand übergeht. Diese Chemilumineszenz kann durch kurzes Auflegen eines Röntgenfilmes (1 s – 1 min) sichtbar gemacht werden. Die Röntgenfilme wurden mit einer automatischen Entwicklermaschine entwickelt.

Um nach dem ECL-Nachweis die Membran ein weiteres mal mit Antikörpern anderer Spezifität zu untersuchen, wurden die Antikörper des ersten Nachweises durch Inkubation in *Stripping*-Puffer entfernt (2×1 h, 40°C oder über Nacht bei 4°C). Danach wurde für den zweiten Nachweis wieder mit dem Blockieren unspezifischer Bindungsstellen begonnen.

Stripping-Puffer: 0,2 M Glycin pH 2,2, 0,1 % (w/v) SDS, 1 % (v/v) Tween-20

2.5.6 Gewinnung von Peptidantiseren

Generell sind Immunisierungen gegen ein Gesamtprotein oder gegen kurze antigene Peptide möglich. Bei einer Immunisierung gegen Peptide erhält man monospezifische Antiseren, was insbesondere bei Proteinen, die ansonsten eine hohe Homologie aufweisen von Vorteil ist.

2.5.6.1 Peptidsynthese

Die Peptidsequenzen zur Immunisierung wurden aufgrund eines Sequenzvergleiches von C α und C β 1/C β 2 und der bekannten Kristallstruktur von C α (Bossemeyer et al., 1993) ausgewählt. Zur anschließenden Kopplung an KLH (*Keyhole limpet hemocyanin*), wurde Cterminal ein Cysteinrest angehängt, bei dem relativ kurzen C β (63-68)-Peptid wurden zusätzlich zwei Glycinreste als Spacer eingefügt.

Bezeichnung	Sequenz	pI
Ca (35-46)	QNTAHLDQFERIC	4,2
Сβ (35-46)	PNNAGLEDFERKC	5,4
Cβ (63-68)	KATEQYGGC	7,4

Die Peptide wurden von Herrn Dr. H.-R. Rackwitz, Abt. Zellbiologie, DKFZ Heidelberg mittels Festphasensynthese unter Verwendung der Fmoc-Strategie synthetisiert und über RP-HPLC gereinigt. Anschließend wurden die Peptide über Glutaraldehyd an KLH als Träger gekoppelt. Die gekoppelten Peptide wurden in einer Konzentration von ca. 2 mg/ml in PBS gelöst.

2.5.6.2 Immunisierung

Die Immunisierung wurde von der Firma Eurogentec, Seraing, Belgien nach einem Standardprotokoll an zwei Kaninchen pro antigenem Peptid durchgeführt. Vor der Immunisierung wurde den Tieren Blut entnommen, aus dem das Präimmunserum gewonnen wurde. Die Immunisierung erfolgte mit je 20-100 µg Antigen in einem Volumen von 1 ml (500 µl Antigenlösung + 500 µl Freundsches Adjuvans). Die Erstinjektion am Tag 0 wurde subkutan mit komplettem Freundschen Adjuvans (Mannidmonooleat, Paraffinöl, *Mycobacterium butyricum*, hitzeinaktiviert) verabreicht, bei den Folgeinjektionen (*Boost*) am Tag 14, 28 und 56 wurde das inkomplette Adjuvans ohne Mycobakterien eingesetzt. Das Adjuvans wirkt als Depot für das Antigen und verstärkt die Immunantwort des Tieres.

Zur Kontrolle der Immunisierung wurden am Tag 38 und 66 Blutproben entnommen (2 ml). Die Endblutung erfolgte am 80. Tag nach Beginn der Immunisierung. Die erhaltenen Antiseren wurden nach dem jeweiligen antigenen Peptid bezeichnet.

2.5.6.3 Affinitätsreinigung der Antikörper

Die antigenen Peptide wurden zur Affinitätsreinigung an Affi-Gel 15 gekoppelt wie weiter unten beschrieben (2.5.7). Nach der Kopplung wurde 1 ml Gel pro 3 ml zu reinigendes Serum in eine Säule gegeben und mit 5 Säulenvolumen 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,5 M NaCl äquilibriert. Das zu reinigende Antiserum wurde 1:2 mit 0,6 % Tween, 1 M NaCl verdünnt und durch einen 0,2 µM Filter filtriert. Das Filtrat wurde anschließend mehrfach auf die Säule aufgetragen. Nach dem Beladen der Säule folgte ein Waschschritt mit 5 Säulenvolumen Äquilibrierungspuffer, anschließend wurde mit 5-10 Säulenvolumen 0,2 M Glycin/HCl pH 2,5 eluiert. Dabei wurden 400 µl-Fraktionen gesammelt und sofort mit 1M Tris-HCl pH 8,0; 0,5 M NaCl neutralisiert. Der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen wurde nach der Methode von Bradford (2.5.2) bestimmt und ausgewählte Fraktionen im Western-Blot auf ihre Spezifität hin untersucht.

2.5.7 Kopplung von Peptiden an Affi-Gel 10/15

Kopplung von PKI(5-24) an Affi-Gel 10

Das PKI-Peptid wurde für die Affinitätschromatographie (2.5.8) an Affi-Gel 10 gekoppelt. 25 ml Affi-Gel 10 wurden in eine Glasfritte gegeben und mit 100 ml kaltem H₂O_{bidest} sowie mit 50 ml 100 mM MOPS pH 8,5 gewaschen und danach in ein 50 ml Falcon Gefäß überführt. 18 mg PKI-Peptid wurden in H₂O_{bidest} gelöst und zu dem Affinitätsmaterial hinzugegeben. Mit 100 mM MOPS pH 8,5 wurde das Volumen auf 50 ml aufgefüllt und auf einem Rotationsschüttler für 4 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das Gelmaterial durch Zentrifugation bei 1000 × g für 5 min bei 4°C sedimentiert, der Überstand entfernt und mit 100 mM MOPS pH 8,5 wieder auf 50 ml aufgefüllt. Zum Blockieren der noch verbliebenen reaktiven Gruppen wurden 2,5 ml (100 µl pro ml Affi-Gel10) 1 M Ethanolamin pH 8,0 zugegeben und 1 h bei 4°C inkubiert. Zuletzt wurde das Gelmaterial mit 100 mM MOPS pH 8,5, H₂O _{bidest} und TMN 50 Puffer gewaschen und war so für die Affinitätschromatographie einsetzbar.

Kopplung von Peptiden zur Antikörperreinigung:

Die Peptide C α (35-46) und C β (35-46) wurden an Affi-Gel 15 (BioRad, München) gekoppelt, da dieses Material nach Herstellerangabe besser zur Kopplung von Peptiden mit niedrigem pI geeignet ist.

Pro Peptid wurden 2 ml Affi-Gel 15-Suspension in ein 15 ml Falcon Gefäß gegeben, bei $600 \times g$ sedimentiert, der Überstand abgenommen und das Material 3 mal mit je 5 ml kaltem H₂O_{bidest} gewaschen. Etwa 1 mg des C α (35-46)-Peptids wurde in 0,5 ml Acetatpuffer (100 mM, pH 4,8) gelöst, 1 mg C β (35-46)-Peptid in 0,5 ml 100 mM MES-Puffer pH 5,8, da die Kopplungseffizienz bei Affi-Gel 15 bei einem pH knapp über dem pI des Liganden am besten ist. Die Peptidlösungen wurden zum Gelmaterial zugegeben und die Suspension über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden noch reaktive Ester durch Zugabe von 100 µl 1 M Ethanolamin pH 8,0 blockiert und das Gelmaterial danach gründlich mit dem jeweiligen Kopplungspuffer gewaschen.

2.5.8 PKI(5-24) Affinitätschromatographie

Die PKI(5-24) Affinitätschromatographie ermöglicht die Einschrittreinigung aktiver katalytischer Untereinheiten der cAMP-abhängigen Proteinkinase aus Zell- und Gewebeextrakten (Olsen and Uhler, 1989). Grundlage für diese Methode ist die hochaffine Bindung der C-Untereinheiten an das PKI- (Proteinkinase-Inhibitor) Peptid, das die C α -Isoform mit einer K_i von 2,3 nM inhibiert (Cheng et al., 1986). Die Peptidsequenz ist aus der Aminosäuresequenz des hitzestabilen Proteinkinase-Inhibitors aus Skelettmuskelgewebe abgeleitet (Ashby und Walsh, 1972). Die C-Untereinheiten binden das Inhibitorpeptid nichtkompetitiv in bezug auf das Co-Substrat MgATP und können so über eine PKI(5-24) Affinitätssäule aufgereinigt werden.

Das PKI-Peptid wurde an Affi-Gel 10 gekoppelt (2.5.6) und dieses Affinitätsmaterial nach Äquilibrierung in TMN 50 Puffer (50 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 50 mM Tris pH 7,4) im Batch Verfahren 1-2 h bei 4°C mit dem Zellextrakt inkubiert. Pro mg zu erwartende C-Untereinheit wurden etwa 0,5 ml des PKI-Affi-Gels verwendet. Der Extrakt war zuvor auf 1 mM ATP, 2 mM MgCl₂ eingestellt worden. Bei der Reinigung aus Rinderherzgewebe wurden zusätzlich 20 µM cAMP zugegeben, um das PKA-Holoenzym in R- und C-Untereinheiten zu dissoziieren. Nach der Inkubation wurde das PKI-Affi-Gel in geeignete Säulen gepackt. Es folgten zwei Waschschritte mit 5 Säulenvolumen TMN 50 +400 µM ATP und 6 Volumen TMN 250 (250 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 50 mM Tris pH 7,4) +400 µM ATP. Die Elution der C-Untereinheiten von der Säule erfolgte mit Arginin-Elutionspuffer. (200 mM Arginin, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4).

Für die Analyse kleiner Mengen an Lysat wurde die PKI-Affinitätschromatographie im Minibatch-Verfahren durchgeführt. Dazu wurde der Zellextrakt wie oben beschrieben mit 100 μ l PKI-Affi-Gel in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß inkubiert. Anschließend wurde das Affinitätsmaterial bei 2000 × g sedimentiert, der Überstand abgenommen und mit je 1 ml TMN 50 + 400 μ M ATP und TMN 250 + 400 μ M ATP gewaschen. Die Elution erfolgte mit 100 μ l 1 × SDS Probenpuffer und Erhitzen auf 95°C für 5 min. Nach dem Abzentrifugieren der Probe wurde ein Aliquot über SDS-PAGE analysiert.

2.5.9 StrepTactin-Affinitätschromatographie

Zur Reinigung von *Strep*-tag II Fusionsproteinen wurde die Einschritt-Affinitätsreinigung an StrepTactin-Agarosesäulen durchgeführt. StrepTactine sind Streptavidin-Varianten, die für die Bindung an das *Strep*-tag II-Peptid optimiert wurden (Voss and Skerra, 1997).

Abweichend von der zuvor beschriebenen Methode (2.5.1.1) wurden die *E. coli* Zellen für die StrepTactin Affinitätschromatographie pro 100 ml Ausgangskultur in 1 ml Puffer W (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) resuspendiert, bevor sie mittels Ultraschallbehandlung lysiert wurden. Sollte selektiv der periplasmatische Raum aufgeschlossen werden, enthielt der Puffer zusätzlich 500 mM Saccharose und die Suspension wurde zur Lyse der äußeren Bakterienmembran 30 min auf Eis inkubiert. Die Lysate wurden danach bei 14000 Upm und 4°C in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert und der Überstand (Gesamtzell- bzw. periplasmatische Extrakt) in ein frisches Gefäß überführt.

Um zu verhindern, dass während der Affinitätschromatographie kovalent biotinylierte Proteine oder freies Biotin nahezu irreversibel an die StrepTactin-Agarose binden, wurde dem Proteinextrakt Avidin in einer Endkonzentration von 1 nM zugesetzt, für 30 min bei 4°C inkubiert und entstehende Aggregate abzentrifugiert. Avidin maskiert effizient das vorhandene Biotin, erkennt aber das *Strep*-tag II nicht.

Die Affinitätschromatographie wurde mit 1 ml StrepTactin Agarosesäulen (Institut für Bioanalytik, Göttingen), die zuvor mit 5ml Puffer W äquilibriert wurden, durchgeführt. Der Proteinextrakt wurde auf die Säule gegeben und diese anschließend mit 5×1 ml Puffer W gewaschen. Die Elution des Fusionsproteins erfolgte mit $6 \times 0,5$ ml Puffer W + 2,5 mM Desthiobiotin. Die Säule konnte anschließend durch Spülen mit 3×5 ml Puffer W + 1 mM HABA [2-(4-hydroxyphenylazo)benzoesäure] und 2×4 ml Puffer W regeneriert werden.

2.5.10 Proteinkinase-Assays

Plättchentest:

Die Phosphotransferase-Aktivität der katalytischen Untereinheiten der PKA wurde mit einem modifizierten radioaktiven Aktivitätstest nach Roskoski untersucht (Roskoski, 1983). Der Test besteht aus der Phosphorylierungsreaktion, deren Abstoppen, dem Auftropfen auf Phosphocellulosepapier, Waschen der Phosphocellulose und der Messung der darauf verbliebenen Radioaktivität. Als Substrat wurde das Heptapeptid Kemptid (LRRASLG) verwendet, das aufgrund seiner basischen Reste an der Phosphocellulose haftet.

Die einzelnen Komponenten wurden in einem 0,5 ml Eppendorfgefäß zusammenpipettiert. Zu 25 μ l 4× Reaktionspuffer (40 mM MgAc, 200 mM MOPS pH 6,8) wurden 10 μ l Kemptidlösung (20 μ M – 2 mM), sowie die zu untersuchende Probe gegeben (2,5-5 nM gereinigte C-Untereinheit oder 10 μ l Zelllysat) und mit H₂O_{bidest} auf 90 μ l aufgefüllt. Kontrollreaktionen enthielten keine Kinase. Die Ansätze wurden 2 min bei 30°C inkubiert und dann die Reaktion durch Zugabe von 10 μ l ATP-Lösung (10 μ M – 1 mM ATP, 2-200 μ Ci/ml γ -³²P-ATP) gestartet. Nach 2 min bei 30°C wurde die Phosphorylierungsreaktion mit 10 μ l kaltem 1 M ATP pH 7,0 gestoppt. Von den 110 μ l Gesamtvolumen wurden 80 μ l auf P81-Phosphocelluloseplättchen mit 2 cm Kantenlänge aufgetropft. Anschließend wurden die Plättchen unter viermaligem Wechsel in 30 % Essigsäure gewaschen, um nichtinkorporiertes γ -³²P-ATP zu entfernen. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität des γ -³²P-ATP wurden 1 μ l Aliquots der ATP-Lösung ohne die Waschprozedur auf P81-Plättchen aufpipettiert. Die Plättchen wurden in 4 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben und die inkorporierte Radioaktivität in einem Szintillationszähler bestimmt.

Der Assay wurde der jeweiligen Fragestellung angepasst. Bei der Bestimmung von K_M-Werten für ATP bzw. Kemptid wurde die Konzentration des zu untersuchenden Substrats variiert, während das jeweils andere Substrat in einer nicht begrenzenden Konzentration eingesetzt wurde. Dabei wurde zuvor überprüft, ob bei der verwendeten Enzymkonzentration die Produktbildung linear mit der Zeit verlief. Die K_M-Werte wurden unter Annahme einer Michaelis-Menten Kinetik mit der Software *GraFit 3.0* berechnet. Bei Inhibitionsstudien mit PKI(5-24)-Peptid oder R-Untereinheiten wurde der Inhibitor mit den übrigen Komponenten zusammen in das Reaktionsgemisch gegeben. Im Falle der RIIα-Untereinheit wurde das ATP in den Reaktionsmix gegeben und die Reaktion durch Zugabe von Kemptid gestartet.

Phosphorylierungsassay mit Histonen:

Prinzipiell ist der oben beschriebene Plättchentest auch mit Histonen als Substrat durchführbar, es zeigte sich jedoch, dass die dabei erhaltenen Aktivitäten nur wenig über dem Hintergrund lagen. Daher wurde die Phosphorylierung über SDS-PAGE mit anschließendem Phospho-Imaging untersucht. Die Phosphorylierungsreaktion wurde analog zum Plättchentest mit Histonen als Substrat durchgeführt, das Reaktionsvolumen betrug jedoch nur 80 µl, die Reaktion wurde mit 8 µl ATP-Lösung (1 mM, 200 µCi/ml γ -³²P-ATP) gestartet und mit 20 µl 5× SDS-Probenpuffer abgestoppt. Die Proben wurden für 3 min auf 95°C erhitzt und Aliquots davon im SDS-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie Blau R250 gefärbt, getrocknet und für 1-4 h auf einer Phosphoimaging-Platte exponiert, die anschließend in einem BAS 1500 Reader eingescannt wurde. Die Auswertung erfolgte mit der Software *TINA*.

2.5.11 Interaktionsmessungen mit Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR)

Oberflächen-Plasmonresonanz Messungen wurden mit Hilfe eines BIAcore 2000 Gerätes (Biacore AB, Schweden) in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Herberg am Institut für Physiologische Chemie der Ruhr-Universität Bochum durchgeführt.

Oberflächen-Plasmonresonanz ist ein elektronisches Phänomen, das am Übergang zwischen einer Edelmetalloberfläche und einem dielektrischen Medium wie Luft oder Wasser auftritt. Monochromatisches, polarisiertes Licht wird in einem Winkelbereich, unter dem Totalreflexion stattfindet, auf die Oberfläche eingestrahlt. Dadurch entsteht an der Metalloberfläche eine evaneszente elektromagnetische Welle und es kommt zu einem Resonanzenergietransfer, der wiederum die Intensität des reflektierten Lichts bei einer bestimmten Kombination von Einfallwinkel und Wellenlänge stark reduziert. Der Einfallwinkel des eingestrahlten Lichts, unter dem es zur Oberflächen-Plasmonresonanz kommt, ist vom Brechungsindex an der Oberfläche abhängig, der durch das an die Oberfläche adsorbierte Material verändert wird.

Mit dem BIAcore 2000 Gerät kann so die Interaktion zwischen einem auf der Sensoroberfläche immobilisierten Liganden und einem in der Flussphase befindlichen Analyten in Realzeit verfolgt werden. Die Bindung des Analyten an den Liganden führt zu einer Massenänderung an der Sensoroberfläche, was eine proportionale Änderung des Brechungsindex hervorruft, die als Änderung im SPR-Signal gemessen werden kann. Diese Änderung des SPR-Signals wird in "response units" (RU) angegeben und ist für eine bestimmte Massenänderung bei allen Proteinen und Peptiden gleich. 1000 RU entsprechen einer Oberflächenkonzentration von 1 ng/mm² (Stenberg et al. 1991). Assoziations- (k_a) und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_d) können getrennt voneinander bestimmt werden und daraus bei bekannter Konzentration des Analyten apparente Gleichgewichtsbindungskonstanten (K_D) berechnet werden. Diese kinetischen Konstanten wurden mit nicht-linearer Regression mit der *Biaevaluation 3.0*-Software (Biacore) berechnet. Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante wurde nach

$$R = \frac{k_a C R_{\max}}{\left(k_a C + k_d\right) \times \left(1 - e^{-\left(k_a C + k_d\right)t}\right)}$$

berechnet. Dabei ist R das SPR-Signal in "response units" (RU), C die Konzentration des k_a die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante injizierten Analyten, und k_d die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante. Durch diese Gleichung wird das SPR-Signal zu jeder beliebigen Zeit t während der Assoziationsphase beschrieben. Die Gleichung wird für die nicht-lineare Regressionsanalyse einzelner Kurven herangezogen. Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_d wurde gemäß

$$R_t = R_0 e^{-k_d \left(t - t_0\right)}$$

bestimmt, wobei R_t das SPR-Signal zu einer definierten Zeit t während der Dissoziation ist und R_0 das Signal zu einer willkürlich gewählten Startzeit t_0 . Aus den Geschwindigkeitskonstanten ergibt sich die Gleichgewichtsbindungskonstante nach

$$K_D = \frac{k_d}{k_a}$$

2.5.11.1 SPR-Messungen mit C- und R-Untereinheiten

Zur Bestimmung von Interaktionen zwischen C β 1 bzw. C β 2 und den regulatorischen Untereinheiten vom Typ I und II wurden die C-Untereinheiten zunächst über eine NAP5-Säule (Pharmacia, Freiburg) in 10 mM Acetatpuffer pH 5,6, 2 mM MgCl₂, 1 mM ATP umgepuffert und anschließend über Aminkopplung mit EDC-NHS-Chemie auf einer Carboxymethyldextran-Oberfläche (CM5 Sensor Chip, Biacore, Schweden) immobilisiert. Dabei wurde eine geringe Belegungsdichte (30-100 RU) gewählt, um auch möglicherweise geringe Unterschiede messen zu können. Die cAMP-freien R-Untereinheiten wurden mit einer Flussrate von 30 µl/min in 20 mM MOPS pH 7, 150 mM KCl, 1 mM DTT mit oder ohne 1 mM ATP, 10 mM MgCl₂ in verschiedenen Konzentrationen (1 – 500 nM) injiziert. Die Assoziationsphase wurde für 6 min verfolgt, dann wurde die Dissoziation durch Injektion

von Puffer ohne R-Untereinheiten eingeleitet. Die Regeneration der Sensoroberfläche erfolgte durch Injektion von Laufpuffer mit 100 μ M cAMP und 2,5 mM EDTA.

Bei diesen Messungen diente eine Oberfläche mit immobilisierter boviner oder muriner C α -Untereinheit als Kontrolle (die murine C α -Untereinheit wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Friedrich W. Herberg zur Verfügung gestellt). Des weiteren wurde eine Kontrolloberfläche ohne Liganden eingesetzt, um die unspezifische Bindung des Analyten an die Oberfläche bestimmen zu können.

2.5.11.2 SPR-Messungen mit C-Untereinheiten und GST-PKI

Da für die Dissoziation eines Komplexes zwischen katalytischen Untereinheiten der PKA und dem hitzestabilen Proteinkinaseinhibitor (PKI) bislang keine physiologische Methode bekannt ist, ist die direkte Kopplung eines Bindungspartners an die Sensoroberfläche nicht sinnvoll. Stattdessen kann der als GST-Fusionsprotein exprimierte PKI indirekt über an die carboxymethylierte Dextranoberfläche gekoppelte anti-GST Antikörper (Biacore, Schweden) immobilisiert werden (Zimmermann, 1999). Eine Regeneration dieser Oberfläche ist dann mit 10 mM Glycin (pH 2,2) oder 0,5 % SDS möglich. Für die folgende Messung wird die anti-GST Oberfläche erneut mit GST-PKI beladen.

Für die Messungen wurden 200 RU GST-PKI immobilisiert und die C-Untereinheiten in Arginin-Elutionspuffer (2.5.8) mit 1 mM ATP, 10 mM MgCl₂ in Konzentrationen von 5-50 nM bei einer Flussrate von 30 µl/min injiziert. Die Regeneration erfolgte durch zwei einminütige Injektionen von 10 mM Glycin, pH2,2 gefolgt von einer Injektion mit 0,5 % SDS. Anschließend wurde eine erneute Immobilisierung des GST-PKI Fusionsproteins mit dem gleichen Beladungsgrad auf der Oberfläche durchgeführt (Zimmermann, 1999).

3 Ergebnisse

3.1 Gewinnung isoform-spezifischer Antiseren

Spezifische Antikörper sind ein unentbehrliches Werkzeug zur Identifizierung bestimmter Proteine in zellulären Extrakten. Dies gilt besonders für die hochhomologen Isoformen der C-Untereinheit mit ihren sehr ähnlichen biochemischen Eigenschaften . Es war daher wünschenswert, über Antikörper zu verfügen, mit denen zwischen den Isoformen C α und C β der katalytischen Untereinheit der PKA differenziert werden kann. Ein anti-CB2-Peptidantiserum, das gegen die Aminosäuren 3-14 des CB2-spezifischen N-Terminus gerichtet ist, stand bereits zur Verfügung (Thullner 1997). Für die Unterscheidung zwischen Cα und Cβ-Isoformen wurden in einigen Untersuchungen kommerzielle Antikörper der Firma Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg) verwendet (Pfeifer et al., 1996). Deren Antikörper anti-PKA a-cat bzw. B-cat sind gegen die 20 C-terminalen Aminosäuren der jeweiligen humanen Isoformen gerichtet, die sich dort aber nur in vier Positionen voneinander unterscheiden, die bovinen katalytischen Untereinheiten sogar nur in dreien (Abbildung 4). In den vorliegenden Untersuchungen erwiesen sich diese Antikörper jedoch nicht als geeignet, die C-Isoformen zu unterscheiden. Sie reagierten vielmehr mit beiden Isoformen in gleichem Maße. Aus diesem Grund wurden sie im folgenden zum universellen Nachweis aller Isoformen eingesetzt (vgl. z.B. Abbildung 7, Spur rCα).

Zur Gewinnung von isoform-spezifischen Antiseren wurden aufgrund eines Sequenzvergleichs zwischen boviner C α und C β Untereinheit und der bekannten Röntgenkristallstruktur von C α (Bossemeyer et al. 1993) die Sequenzen von AS 35-46 der jeweiligen Isoform ausgewählt (Abbildung 4). Die entsprechenden Peptide wurden von Herrn Dr. H.-R. Rackwitz, Abt. Zellbiologie, DKFZ Heidelberg synthetisiert und an KLH (keyhole limpet hemocyanin) gekoppelt (2.5.6.1).

Die Immunisierung von Kaninchen wurde bei der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) in Auftrag gegeben (2.5.6.2).

3.1.1 Charakterisierung der Peptidantiseren

Zur Charakterisierung der Antiseren wurden zunächst Lysate von Bakterien verwendet, die die entsprechende Isoform (C α bzw. C β 2) überexprimierten (3.4.1) oder affinitätsgereinigtes C α -Protein. Aliquots der *E. coli*-Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine

PVDF-Membran geblottet. Der Nachweis erfolgte beim anti-C β (35-46) Antiserum mit einer 1:10000 Verdünnung, bei anti C α (35–46) mit 1:5000 verdünntem Antiserum.



Abbildung 4: Schematische Darstellung der bovinen C-Untereinheiten mit den Epitopen der verwendeten Antikörper

Gezeigt sind die von den unterschiedlichen ersten Exons codierten Aminosäuresequenzen und die antigenen Regionen der verwendeten Antikörper. C β 1 und C β 2 unterscheiden sich nur im von Exon 1 codierten N-Terminus, C α und C β 1 sind zu 93% identisch.

Anti-Cβ(35-46) Serum färbte im Lysat von Cβ2-exprimierenden Bakterien eine Bande bei ca. 46 kDa an, was dem Molekulargewicht von Cβ2 entspricht, sowie mehrere Proteine geringeren Molekulargewichts, bei denen es sich offenbar um Abbauprodukte von Cβ2 handelt (vgl. Abschnitt 3.4). Bis auf eine Bande ließen sich diese Signale durch Zugabe steigender Mengen des antigenen Peptids abschwächen oder ganz auslöschen (Abbildung 5A). Da die genannte Bande auch in Lysaten von Zellen zu sehen war, die nur mit dem Expressionsvektor transfiziert worden waren, und auch durch das Präimmunserum erkannt wurde (Daten nicht gezeigt), handelt es sich dabei nicht um eine spezifische Reaktion des Antikörpers.

Ein ähnliches Bild ergab sich beim Test des Antiserums gegen das $C\alpha(35-46)$ -Peptid. Das Antiserum erkannte ein ca. 40 kDa großes Protein im Lysat von C α exprimierenden

Ergebnisse

Bakterien, das jedoch weder in Kontrolllysaten noch bei C β 2 exprimierenden Bakterien detektierbar war. Darüber hinaus zeigte sich keine Kreuzreaktion mit dem 46 kDa großen C β 2 Protein, noch dessen Abbauprodukten (Abbildung 5B)



Abbildung 5: Test der Antiseren

A Test des anti C β (35-46) Antiserums: Lysat von C β 2 exprimierenden Bakterien (ca. 100 μ g Gesamtprotein) wurde zusammen mit Lysat von Bakterien, die mit einem leeren Expressionsvektor transformiert wurden (Spur "K") und mit affinitätsgereinigtem rekombinantem C α -Protein (0,5 μ g) über SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membran transferiert. Identische Streifen der Membran wurden mit einer 1:10000 Verdünnung des Antiserums getestet und die Spezifität durch Zugabe des antigenen Peptids überprüft.

B Test des anti C α (35-46) Antiserums: Durchführung wie bei **A**, jedoch wurde auch bei C α Lysat von C α exprimierenden Bakterien verwendet.

Da insbesondere beim anti-C β Antiserum noch ein relativ starkes Hintergrundsignal auftrat wurden die Antiseren anschließend wie beschrieben (2.5.6.3) über eine Affinitätssäule mit dem jeweiligen antigenen Peptid, welches an AffiGel15 (BioRad, München) gekoppelt war, gereinigt. Durch diese Reinigung konnte das Signal-Rauschverhältnis, wie sich auch in den folgenden Untersuchungen zeigte, deutlich verbessert werden. Mit Hilfe der auf der Basis von Sequenzvergleichen und der Röntgenkristallstruktur von C α ausgewählten Peptidsequenzen ist es damit gelungen, Peptidantikörper zu gewinnen, die eine Unterscheidung zwischen bovinen C α und C β -Isoformen im Western-Blot erlauben.

3.2 Untersuchungen an Rinderherzgewebe

Da es aufgrund des Fehlens geeigneter Antikörper zuvor nicht möglich war, zwischen nativen $C\alpha$ und C β -Isoformen zu unterscheiden, war es von Interesse, deren Vorkommen in Rinderherzgewebe zu untersuchen, aus dem seit langer Zeit routinemäßig C-Untereinheiten gereinigt werden (Kübler et al., 1979). Dazu wurden Homogenate aus tiefgefrorenem Rinderherzgewebe hergestellt (2.5.1.3), und die katalytischen Untereinheiten der PKA über PKI(5-24) Affinitätschromatographie gereinigt. Aliquots des Extraktes und des Eluates aus der Reinigung wurden über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf PVDF-Membranen geblottet. Der Nachweis der C α und C β -Isoformen der katalytischen Untereinheiten der PKA erfolgte mit den affinitätsgereinigten Peptidantiseren.

Im SDS-Gel (Abbildung 6a) zeigen die affinitätsgereinigten C-Untereinheiten aus Rinderherzgewebe neben der Hauptbande, die der Größe von C α entspricht (ca. 40 kDa) eine schwache Bande von ca. 46 kDa Molekulargewicht, die mit dem C β 2-spezifischen Antiserum als C β 2 identifiziert werden kann (Abbildung 6b, Spur 3). Auch im Rohextrakt lässt sich das Protein nachweisen (Spur 2). Das C β 2-Protein reagiert ebenfalls mit dem anti-C β (35-46) Antiserum (Abbildung 6c, Spur 3), nicht aber mit dem anti-C α (35-46) Antiserum (Abbildung 6c, Spur 3), nicht aber mit dem anti-C α (35-46) Antiserum (Abbildung 6d), was die Spezifität dieser Antiseren nochmals bestätigt. Im Eluat aus der Affinitätschromatographie lässt sich sowohl C α als auch C β 1 nachweisen, die im SDS-Gel als gemeinsame Bande zu sehen sind. Eine Unterscheidung dieser Untereinheiten war bislang aufgrund des Mangels an spezifischen Antikörpern nicht möglich. Aufgrund massenspektrometrischer Untersuchungen wurde der Anteil von C β 1 jedoch zuvor auf etwa 30% geschätzt (Jedrzejewski et al., 1998). Eine Quantifizierung der Signale war aufgrund der unterschiedlichen Sensitivität der Antiseren nicht durchführbar.



Abbildung 6: Nachweis von C-Untereinheiten aus Rinderherzgewebe

Rohextrakt aus Rinderherzgewebe, sowie daraus affinitätsgereinigte katalytische Untereinheiten wurden zusammen mit rekombinant exprimiertem C α -Protein über SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF-Membranen geblottet und wie angegeben mit den jeweiligen Peptidantiseren nachgewiesen. Das linke Bild zeigt ein identisches Coomassie-gefärbtes Gel. Die Position des C β 2-Proteins in Gel und Blot ist mit einem Doppelpfeil markiert. Spur 1: rekombinante C α -Untereinheit, Spur 2: Rohextrakt aus Rinderherzgewebe, Spur 3: affinitätsgereinigte C-Untereinheiten aus Rinderherzgewebe.

Ein densitometrischer Scan des Coomassie-gefärbten Gels erlaubte jedoch eine Schätzung des Anteils von C β 2 auf etwa 2,5% der gesamten C-Untereinheiten.

Diese Untersuchungen bestätigen die Spezifität der hergestellten Peptidantikörper für die C α bzw. C β -Isoformen. Darüber hinaus konnten so die Befunde aus früheren Untersuchungen zum Vorkommen von C β 2 in Rinderherzgewebe bestätigt werden (Thullner et al. 1997).

3.3 Untersuchungen in CHO-Zelllysaten

Da die Selektivität der Antiseren für die bovinen Proteine durch die oben angeführten Untersuchungen gezeigt werden konnte, war es aufgrund der hohen Konserviertheit der katalytischen Untereinheiten der PKA von Interesse, ob dies auch für C-Untereinheiten aus anderen Spezies gilt. Bereits zuvor wurden in unserem Labor Studien an cAMP-resistenten CHO-Zelllinien durchgeführt (Thullner 1997, Thullner et al. 2000). Die Zelllinie CHO₁₀₂₆₀, die von CHO₁₀₀₀₁ abstammt (Gottesman et al., 1980), zeigt einen solchen Phänotyp aufgrund einer deutlich geringeren PKA-Aktivität (Gottesman et al., 1980; LeCam et al., 1981), welche einhergeht mit einer deutlich geringeren Menge immunreaktiver C-Untereinheiten (Murtaugh et al., 1982). Zum Zeitpunkt der Isolation dieser Mutanten war nur die C α -Untereinheit als Hauptisoform bekannt und aufgrund des Fehlens spezifischer Antikörper konnte auch später nicht festgestellt werden, ob tatsächlich beide Hauptisoformen, C α und C β 1, von der Mutation betroffen sind. Eine C β 2 mRNA sowie das Protein selbst konnten bereits nachgewiesen werden (Wiemann et al. 1996, Thullner et al. 2000).

Da sich herausstellte, dass die Menge an C-Untereinheiten im Zelllysat von CHO-Zellen unterhalb der Nachweisgrenze der verwendeten Antiseren lag (Daten nicht gezeigt), wurde eine Anreicherung über PKI(5-24) Affinitätschromatographie im Minibatchverfahren durchgeführt wie unter 2.5.8 beschrieben. Die Eluate wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf PVDF-Membran transferiert. Als Kontrolle diente rekombinantes C α -Protein. Der Nachweis erfolgte mit dem C β -spezifischen Antiserum (anti-C β (35-46)) bzw. dem anti-PKA_{βcat} Antikörper, der alle Isoformen detektiert. Erstaunlicherweise reagierte das anti-C α (35-46) Antiserum nicht mit dem C α -Protein aus CHO₁₀₀₀₁ (Daten nicht gezeigt). Der Grund liegt vermutlich darin, dass es im Bereich der antigenen Sequenz zwischen boviner und muriner Sequenz geringfügige Unterschiede gibt (s.u.). Das Ergebnis der Untersuchungen zeigt Abbildung 7.



Abbildung 7: Antikörpernachweis der C-Untereinheiten aus Wildtyp- und cAMP-resistenten CHO-Zellen

Die CHO-Zelllinien 10001 und 10260 wurden auf ihren Gehalt an C α und C β 1 hin untersucht. Konfluent gewachsene Zellen (3 × 10⁷ Zellen) wurden lysiert, bei 13000 Upm abzentrifugiert und ca. 2 mg Protein des Überstands für die PKI-Affinitätsreinigung im Minibatchverfahren mit 100 µl PKI(5-24)-AffiGel eingesetzt. Nach dem Waschen des Affinitätsmaterial wurden die gebundenen Proteine durch Erhitzen in 100 µl SDS-Probenpuffer eluiert. Aliquots der Eluate wurden zusammen mit rekombinantem C α -Protein einer SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot unterzogen. Die aufgetragenen Proteinmengen waren dabei vergleichbar, wie eine Amidoschwarz-Färbung der Blotmembranen zeigte. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit dem kommerziellen antiPKA_{βcat} Antikörper der alle Isoformen erkennt und dem C β -spezifischen anti C β (35-46) Antiserum. Rekombinant hergestelltes C α -Protein diente als Kontrolle. Die jeweiligen Zelllinien sind über den einzelnen Spuren angegeben, der zur Detektion verwendete Erstantikörper rechts daneben.

Während die CHO₁₀₀₀₁-Zellen, die den normalen cAMP-sensitiven Phänotyp besitzen, mit dem anti-PKA_{Bcat} Antikörper eine deutliche Immunfärbung zeigen, ist das Signal bei den cAMP-resistenten CHO₁₀₂₆₀ nur äußerst schwach. Dieser Befund stimmt mit der Literatur überein (Murtaugh et al., 1982). Überraschenderweise zeigen jedoch beide Zelllinien mit dem Cβ-spezifischen Antiserum vergleichbar starke Banden, was bedeutet, dass die Menge an Cβ1 in den CHO₁₀₂₆₀ Zellen im Gegensatz zu C α nicht vermindert ist. Die Gesamtmenge an Cβ1 scheint dabei relativ gering zu sein, wenn man die sehr schwache Immunfärbung mit dem anti PKA_{βcat} Antikörper betrachtet. Dennoch zeigt dieser Befund, dass die Defizienz an C-Untereinheiten, die für den cAMP-insensitiven Phänotyp der CHO₁₀₂₆₀ Zellen verantwortlich gemacht wird, auf C α beschränkt zu sein scheint.

Der Befund, dass der bovine anti-C α (35-46) Antikörper nicht geeignet war, die C α -Untereinheit in CHO-Zellen nachzuweisen, war aufgrund der hohen Homologie des Proteins über Speziesgrenzen hinweg zunächst unerwartet. Ein Sequenzvergleich dieses Bereiches zeigt jedoch, dass sich die beiden Spezies Hamster und Rind im zentralen Teil der Sequenz leicht unterscheiden:

 $^{35}Q N T A H L D Q F E R I^{46}$ $^{35}Q N T A Q L D H F D R I^{46}$ Hamster (Cricetulus griseus)

Wie Abbildung 8 zeigt, liegt die Peptidsequenz gegen welche die Antikörper gerichtet sind, in der Kristallstruktur der bovinen C α -Untereinheit an der Proteinoberfläche. Der einzige Unterschied zwischen bovinem und murinem C α -Protein in diesem Bereich ist eine Vertauschung der Aminosäurereste an den Positionen 39 und 42, Histidin bzw. Glutamin, die in der C α -Kristallstruktur offensichtlich eine H-Brückenbindung eingehen und nach außen gerichtet sind. Da die übrigen Aminosäurereste im fraglichen Bereich identisch sind, bedeutet dies, dass diesen beiden Resten entscheidende Bedeutung bei der Erkennung durch den anti-C α (35-46) Antikörper zukommt.


Abbildung 8: Detailansicht der Kristallstruktur des Ca-Proteins (bovin)

Dargestellt ist der Bereich um die Aminosäurereste 35-46, welche für den Peptidantikörper verwendet wurden. Das Peptidrückgrat ist in grün, α -Helices sind in gelb und β -Faltblattstrukturen in blau dargestellt. Einzelne Aminosäurereste sind als Stäbchenmodelle wiedergegeben. Die Position von Histidin 39 und Glutamin 42 ist angegeben, die Wasserstoffbrückenbindung ist als unterbrochene grüne Linie angezeigt.

3.4 Rekombinante Expression von Cβ2

Bisherige Untersuchungen von C β 2 wurden durch die Tatsache erschwert, dass es aufgrund der großen Homologie zwischen den verschiedenen Isoformen der katalytischen Isoformen nicht möglich war, diese durch klassische biochemische Reinigung voneinander zu trennen. Des weiteren wird zwar die rekombinante Expression von C α in *E. coli* schon seit geraumer Zeit durchgeführt (Slice und Taylor, 1989), die bakterielle Expression von C β 2 im bakteriellen System war jedoch bislang nicht erfolgreich. Im Extrakt C β 2-exprimierender Bakterien konnte zwar Kinaseaktivität nachgewiesen werden, das Protein selbst unterlag aber starker Proteolyse (Thullner, 1997).

3.4.1 Expression von C β 2 mit dem pET-System

Zu Beginn dieser Arbeit lag das Cβ2-Gen bereits in dem Expressionsvektor pET28b vor (vgl. Anhang). Bei diesem Vektor handelt es sich um ein T7-Polymerase basiertes Expressionssystem. Dieses bietet den Vorteil, dass das heterologe Gen ohne Fremdsequenzen oder Fusionsanteile (z.B. Glutathion S-Transferase) exprimiert werden kann und daher mit der

nativen Sequenz in den folgenden Untersuchungen zugänglich ist. Eine Voraussetzung dafür ist jedoch eine etablierte Reinigungsmethode, da die Reinigung über artifizielle Affinitätsanhängsel (z.B. His-tag, GST) nicht möglich ist. Bei den katalytischen Untereinheiten der PKA steht mit der PKI(5-24) Affinitätschromatographie (2.5.8) eine hochspezifische und hochaffine Reinigungsprozedur zur Verfügung.

Bereits früher durchgeführte Expressionsstudien mit dem pET28b-CB2 Konstrukt zeigten, dass das rekombinante C β 2-Protein in dem zur Expression verwendeten Bakterienstamm E. coli BL21(DE3) stark abgebaut wird. Im Western Blot wurden so neben dem intakten Protein Abbauprodukte von 38-44 kDa nachgewiesen werden (Thullner 1997 und Abbildung 9). Dabei handelt es sich höchstwahrscheinlich um eine Degradation vom N-Terminus her, da die verkürzten Proteine zwar mit einem gegen ein C-terminales Epitop gerichteten Antikörper nachgewiesen werden konnten, jedoch nicht mehr mit dem Cβ2(3-14)-Antikörper, der gegen die Aminosäurereste 3-14 am N-Terminus gerichtet ist. Abbildung 9 zeigt einen typischen Expressionsverlauf. Eine 50 ml Expressionskultur wurde bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 mit IPTG induziert und zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen. Aliquots der Proben wurden SDS-Gelelektrophorese und Western-Blotting mittels untersucht. Die Proteindegradation ist bereits zu Beginn der Expression sehr ausgeprägt. Die relative Ausbeute an intaktem Protein nimmt mit zunehmender Expressionsdauer ab. Die Tatsache, dass bereits vor der Induktion der Kultur (t=0) die charakteristischen Abbaubanden zu sehen sind, deutet auf eine basale Proteinexpression hin, die in einer uninduzierten Expression der T7 Polymerase begründet liegen könnte.

Wie Abbildung 9B zeigt, ließen sich die beobachteten Abbauprodukte über PKI-Affinitätschromatographie reinigen, was in Übereinstimmung mit früheren Befunden steht. Dies bestätigt die Identität der Abbauprodukte als Fragmente einer enzymatisch aktiven katalytischen Untereinheit der PKA, da nur so eine Bindung an das PKI-Peptid möglich ist (Girod et al., 1996). Aufgrund des fehlenden N-Terminus sind diese Proteinfragmente für die Charakterisierung des Cβ2 Proteins jedoch nicht geeignet.



Abbildung 9: Abbau von Cβ2 bei der Expression in *E. coli* BL21(DE3) mit dem pET28-Cβ2 Konstrukt

A Analyse des Expressionsverlauf des C β 2-Proteins in BL21(DE3)

Eine 50 ml Expressionskultur wurde zum Zeitpunkt t=0 mit 0,5 mM IPTG induziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 1 ml Aliquots entnommen, die Bakterien sedimentiert und das Pellet in 100 μ l 1× SDS-Probenpuffer aufgekocht. Jeweils 10 μ l dieses Lysates wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf PVDF-Membran geblottet. Die Detektion erfolgte mit dem Antikörper anti PKAβ-cat und einem HRPO-gekoppelten Ziege anti-Kaninchen IgG Antikörper.

B Coomassiefärbung eines SDS-Gels mit affinitätsgereinigtem rekombinantem Cβ2-Protein

Die Bakterien aus der Expressionskultur wurden sedimentiert, in Lysepuffer resuspendiert und mit Ultraschall aufgebrochen. Zelltrümmer wurden bei 20000 g abzentrifugiert und der klare Überstand für die PKI-Affinitätschromatographie verwendet. Das Eluat wurde in einem 11% igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Position des vollständigen Proteins ist mit einem Pfeil markiert.

3.4.1.1 Expression von Cβ2-Mutanten

Edman-Sequenzierungen der Proteinfragmente aus der bakteriellen Expression haben bereits in früheren Untersuchungen gezeigt, dass das Hauptabbauprodukt von ca. 38 kDa mit AS 62 von Cβ2 beginnt, was exakt dem Exon1/Exon2 Übergang auf DNA-Ebene entspricht. Da dieser Aminosäurerest ein Methionylrest ist, lag die Vermutung nahe, dass es sich hier um einen alternativen Translationsstart handelt, zumal auch der Zusatz von Proteaseinhibitorcocktails im Lysat CB2 exprimierender Bakterien den Abbau nicht verhindern konnte. Diese Vermutung konnte jedoch widerlegt werden, da auch rekombinantes Cβ2, bei dem der besagte Methioninrest über ortsspezifische Mutagenese durch einen Alaninoder Leucinrest ersetzt wurde, dasselbe Bandenmuster wie das Wildtyp-Protein zeigten (Thullner 1997, Thullner et al. 2000). Daher wurden die drei vor dem Methionin liegenden Aminosäurereste (Trp₅₉, Arg₆₀, Ser₆₁), mit dem Site-directed Mutagenesis Kit (2.2.13) einzeln zu Alanin mutiert, um so eine mögliche Erkennungsstelle für eine bakterielle Protease zu

Ergebnisse

zerstören. Auch dabei zeigte sich jedoch ein identisches Bild bezüglich des Proteinabbaus (Daten nicht gezeigt), sodass dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde.

3.4.2 Expression von Cβ2 mit dem Strep-tag II Expressionssystem

Um intaktes Cβ2-Protein zu gewinnen, war das pET-System aufgrund des auftretenden Nterminalen Abbaus des rekombinanten Proteins nicht geeignet. Der ursprüngliche Grund für die Wahl des pET-Systems war, dass dieses die Möglichkeit geboten hätte, das Cβ2-Gen mit der authentischen Sequenz zu exprimieren, also ohne zusätzliche vektorstämmige Sequenzen, wie sie häufig bei Fusionsproteinen mit Glutathion S-Transferase zu finden sind. Fusionsanteile können sich jedoch auch stabilisierend auf die Genexpression auswirken (Bowie and Sauer, 1989, Murby et al., 1991;, Koken et al., 1993) und sind unter Umständen auch vollständig abspaltbar. Als möglicherweise geeignete Alternative erschien daher das *Strep-tag II* Expressions- und Reinigungssystem (2.4.2), bei dem der N-terminale Fusionspartner, ein acht Aminosäuren großes, Streptavidin bindendes Peptid, mit Hilfe der Protease Faktor Xa unmittelbar vor dem rekombinanten Protein abgespalten werden kann. Über dieses sogenannte *Strep-tag II* Peptid kann in der Regel auch eine Ein-Schritt Affinitätsreinigung des Fusionsproteins durchgeführt werden. Eine Kopplung dieser Reinigungsmethode mit der PKI-Affinitätschromatographie würde die Eliminierung Nterminal verkürzter Proteinspezies erlauben.

3.4.2.1 Expression mit dem Vektor pASK-IBA6

Das Cβ2-Gen wurde in den Expressionsvektor pASK-IBA6 kloniert wie unter Material und Methoden (2.2.15.1) beschrieben. Dieser Vektor enthält neben der *Strep-tag II* Sequenz auch die bakterielle OmpA-Signalsequenz, die einen Export des Fusionsproteins ins bakterielle Periplasma bewirken soll. Dadurch wäre das Protein dem Wirkungsbereich cytoplasmatischer Proteasen entzogen.

Die Expression selbst wurde den Angaben des Herstellers gemäß durchgeführt (2.4.2). Wie bei der Verwendung des pET-Systems wurden zunächst Testexpressionen in kleinem Maßstab durchgeführt und die Anwesenheit des gewünschten Proteins im Bakterienlysat mittels Immunoblotanalyse überprüft. Tatsächlich zeigte sich, dass bei Expression des pASK-IBA6-Cβ2 Konstruktes in *E. coli* XL-1 Blue das Protein ohne nennenswerten Abbau im bakteriellen Gesamtextrakt zu finden ist (Daten nicht gezeigt). Eine Trennung des Lysates in lösliche und unlösliche Fraktion zeigte jedoch, dass sich das *Strep-tag II*-Cβ2 Fusionsprotein von Beginn der Expression an praktisch vollständig in der unlöslichen Fraktion befand (Abbildung 10). Dies geschah auch unter Expressionsbedingungen, unter denen mit dem pET-System in *E. coli* BL21(DE3) lösliches (wenn auch proteolytisch degradiertes) Protein erhalten wurde.



Abbildung 10: Unlöslichkeit des OmpA-Strep-tagII –Cβ2 Fusionsproteins in E. coli XL1-Blue

Eine 100 ml Kultur von mit pASK-IBA6-C β 2 transformierten *E. coli* XL1 Blue Zellen wurde zum Zeitpunkt t=0 mit 20 µg/l AHT induziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 1 ml Aliquots entnommen, die Bakterien sedimentiert und das Pellet in 100 µl Puffer W (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) resuspendiert. Die Bakterien wurden mit Ultraschall lysiert und das Lysat durch Zentrifugation bei 11000 g in lösliche (L) und partikuläre (P) Fraktion getrennt. Die partikuläre Fraktion wurde in 100 µl 1 x SDS Probenpuffer resuspendiert. Vergleichbare Proteinmengen der einzelnen Fraktionen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf PVDF-Membran geblottet. Die Detektion erfolgte mit dem Antikörper anti PKAβ-cat und einem HRPO-gekoppelten Ziege anti-Kaninchen IgG Antikörper.

Da das *Strep-tag II* System Wirtsstamm-unabhängig ist, wurde der BL21 (DE3) Stamm ebenfalls mit dem pASK-IBA6-C β 2 Konstrukt transformiert und das Genprodukt exprimiert. Eine Immunoblotanalyse des Bakterienlysats zeigte, dass auch in diesem *E. coli*-Stamm ein Protein der gesuchten Größe exprimiert wird (Abbildung 11, Spur 5+6). Das stärkste Signal war in der unlöslichen Fraktion zu beobachten (Spur 6), jedoch konnte im Gegensatz zur Expression in *E. coli* XL1-Blue auch in der löslichen Fraktion ein Protein der erwarteten Größe nachgewiesen werden (Spur 5). In einer Präparation des bakteriellen Periplasmas trat keine korrespondierende Bande auf (Spur 4); das Fusionsprotein wird also trotz der OmpA-Signalsequenz offensichtlich nicht ins Periplasma exportiert. Sowohl in der unlöslichen als auch in der löslichen Fraktion konnte ein Abbau des Genproduktes beobachtet werden, der jedoch deutlich schwächer ausgeprägt war, als bei der Verwendung des pET-Expressionssystems.



Abbildung 11 : Western-Blot Analyse der Expression von pASK-IBA6-Cβ2 in E. coli BL21(DE3)

Eine 100 ml Kultur von mit dem Vektor pASK-IBA6-C β 2 transformierten *E. coli* BL21(DE3) wurde mit 20 μ g/l AHT induziert. Nach 16 h wurden die Zellen geerntet und in periplasmatische, cytoplasmatische und partikuläre Fraktion getrennt (2.5.9). Aliquots der einzelnen Fraktionen wurden zusammen mit Lysat aus nichtinduzierten bzw. mit einem leeren Plasmid transformierten Zellen einer SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot unterzogen. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit dem anti-PKA β_{cat} und einem HRPO-gekoppelten Ziege anti-Kaninchen IgG Antikörper.

Spur 1: Negativkontrolle, leeres Plasmid; *Spur 2:* rekombinante Cα-UE; *Spur 3:* nichtinduzierte Zellen; *Spur 4:* periplasmatischer Extrakt; *Spur 5:* cytoplasmatischer Extrakt; *Spur 6:* partikuläre Fraktion

Da dem Fusionsprotein bei einem N-terminalem Abbau das Strep-tag II fehlt, können solche Abbauprodukte nicht an eine StrepTactin-Affinitätssäule binden, dem Bindungspartner für das Strep-tag II Peptid. Daher wurde CB2-exprimierendes Bakterienlysat einer StrepTactin-Affinitätschromatographie unterzogen, um die unerwünschten verkürzten Proteinspezies zu entfernen. Überraschenderweise zeigte sich jedoch, dass der Anteil an intaktem Fusionsprotein der so gereinigt werden konnte, außerordentlich gering und zudem mit bakteriellen Proteinen verunreinigt war (Abbildung 12A, Spur 5+6). Eine große Menge an Fusionsprotein befand sich im Säulendurchlauf und der 1. Waschfraktion (Abbildung 12B, Spur 2+3), obwohl die Anwesenheit des Streptag II Peptids in Lysat und Säulendurchlauf mit Hilfe eines Streptavidin-Alkalische Phosphatase Konjugates im Western Blot bestätigt werden konnte (Abbildung 12C, Spur 1+2); daher wäre eine Bindung an das Affinitätsmaterial zu erwarten gewesen. Im Eluat zeigt sich jedoch nur eine schwache Färbung im Bereich von 48 kDa. Die hohe Hintergrundfärbung ist vermutlich auf unspezifische Bindungen des Streptavidin-AP Konjugates zurückzuführen. Bei der prominenten Bande im Bereich von etwa 22 kDa handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um das bakterielle Protein BCCP (Biotin carboxyl carrier protein), das mit der Affinitätsmatrix zu interagieren scheint und ebenfalls von dem hier verwendeten Streptavidin-AP-Konjugat detektiert wird. Da dieses Protein mehrfach biotinyliert ist, ist das Signal überproportional stark (vgl. Abbildung 12A und C, Spur 5+6).





Eine 200 ml Kultur von mit dem Vektor pASK-IBA6-C β 2 transformierten *E. coli* BL21(DE3) wurde mit 20 μ g/l AHT induziert. Nach 16 h wurden die Zellen geerntet, lysiert und das Lysat einer StrepTactin-Affinitätschromatographie unterzogen, wie unter 2.5.9 beschrieben. Ausgewählte Fraktionen wurden über SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

A Coomassie-gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel, **B** Western-Blot, Nachweis des C β 2-Proteins mit anti-PKA β_{cat} und einem HRPO-gekoppelten Ziege anti-Kaninchen IgG Antikörper. C Western-Blot, Nachweis des *Strep-tag II* mit einem Streptavidin - Alkalische Phosphatase Konjugat

Spur M: Größenstandard; Spur 1: Lysat; Spur 2: Säulendurchlauf; Spur 3: Waschfraktion 1; Spur 4: Waschfraktion 5; Spur 5: Elutionsfraktion 2; Spur 6: Elutionsfraktion 3.

Die Position des Strep-tagII-OmpA-Cβ2-Fusionsproteins ist durch eine Pfeilspitze markiert.

Darüber hinaus wurde der Versuch unternommen, das StreptagII-C β 2 Fusionsprotein über eine PKI(5-24)-AffiGel-Säule zu reinigen. Auch dabei konnten keine nennenswerten Proteinmengen an die Affinitätssäule gebunden werden, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass durch die Faltung des Fusionsproteins sowohl das *Strep-tag II* als auch das katalytische Zentrum der PKA für die jeweilige Affinitätsreinigung unzugänglich sind. Daneben wäre auch denkbar, dass der Threoninrest 244, welcher Threonin 197 bei C α entspricht, nicht phosphoryliert vorliegt. Diese Phosphorylierung ist essentiell für die korrekte Konformation des katalytischen Zentrums (Steinberg et al. 1993, Girod et al, 1996) und damit auch für die Bindung an das PKI-Peptid.

3.4.2.2 Expression mit dem Vektor pASK-IBA7

Da es aufgrund seiner geringen Größe unwahrscheinlich ist, dass das Strep-tag II Peptid selbst eine anomale Faltung des Proteins verursachen könnte, lag die Vermutung nahe, dass sich die davorliegende OmpA-Signalsequenz störend auswirkt. Wie im vorhergehenden Abschnitt erwähnt, sollte diese Sequenz einen Export des Fusionsproteins ins bakterielle Periplasma ermöglichen. Selektiver Aufschluss des periplasmatischen Raums über osmotischen Schock (2.5.9) zeigte jedoch, dass dies jedoch nicht der Fall war (Abbildung 11, Spur 4), daher erschien der Verzicht auf diese Sequenz sinnvoll. Der Expressionsvektor pASK-IBA7 ist mit dem zuvor verwendeten pASK-IBA6 Vektor bis auf ebendiese *OmpA*-Sequenz identisch. Das Cβ2-Gen konnte durch den Austausch einer Bsp119I / HindIII Kassette in den neuen Vektor kloniert werden. Nach Bestätigung der korrekten Klonierung mittels Restriktionsanalyse wurde eine Testexpression in E. coli BL21(DE3) durchgeführt und das Ergebnis im Immunoblot wie zuvor mit isoformspezifischen Antikörpern untersucht (Abbildung 13). Überraschenderweise zeigte sich ein starker Abbau des Fusionsproteins, sehr ähnlich der bei der Expression im pET-System beobachteten Degradation. Da im Vergleich zur vorhergehenden Expression nur die OmpA-Sequenz fehlte, scheint diese einen Einfluss auf die Stabilität gegenüber bakteriellen Proteasen zu haben, möglicherweise wird durch die Faltung dieser Sequenz die vermutete Proteasespaltstelle unzugänglich.



Abbildung 13: Abbau des Strep-tag II-Cβ2 Fusionsproteins in E. coli BL21(DE3)

Eine 100 ml Kultur von mit pASK-IBA7-C β 2 transformierten *E. coli* BL21 (DE3) wurde mit 20 µg/l AHT induziert. Nach 3 h wurde die Hälfte der Kultur geerntet, die restliche Kultur am folgenden Tag (ÜN). Die sedimentierten Bakterien wurden in 1 ml Puffer W resuspendiert und mit Ultraschall lysiert. Vor der Trennung des Rohextraktes (**R**) in lösliche (**L**) und partikuläre (**P**) Fraktion wurde eine Probe zur Analyse entnommen. Die partikuläre Fraktion wurde in 1 ml 1 x SDS Probenpuffer resuspendiert. Vergleichbare Proteinmengen der einzelnen Fraktionen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf PVDF-Membran geblottet. Die Detektion erfolgte mit dem Antikörper anti PKAβ-cat und einem HRPO-gekoppelten Ziege anti-Kaninchen IgG Antikörper. Als Kontrolle diente rekombinant exprimierte affinitätsgereinigte C α -Untereinheit. Die Position des vollständigen Fusionsproteins ist mit einem Pfeil markiert.

3.4.3 Expression mit rekombinanten Baculoviren

Die Expressionsversuche in *E. coli* zeigten, dass das Cβ2 Protein der rekombinanten Expression in prokaryotischen Systemen nur sehr eingeschränkt zugänglich ist. Eine Alternative zur bakteriellen Genexpression stellt die Expression heterologer Gene in Sf9 Insektenzellen mit Hilfe rekombinanter Baculoviren dar. Dazu wird das zu untersuchende Gen über homologe Rekombination in das Baculovirus-Genom eingebracht, die rekombinanten Viren werden vermehrt und zur Infektion der Sf9-Wirtszellen verwendet. Die infizierten Zellen exprimieren in der Folge das unter der Kontrolle eines starken Promotors stehende Fremdgen. Für die hier beschriebenen Arbeiten wurde das MaxBac Expressionssystem der Firma Invitrogen verwendet.

3.4.3.1 Erzeugung rekombinanter Baculoviren

Die Klonierung des Cβ2-Gens in den pBlueBac4.5 Transfervektor erfolgte wie unter *Material und Methoden* (2.2.15.3) beschrieben. Nach der Identifizierung und Sequenzierung positiver pBlueBac4.5-Cβ2 Klone wurden die aus den Klonen "1" und "5" isolierte Plasmid-DNA für die Kotransfektion mit linearisierter Bac-N-Blue[™] Virus-DNA in Sf9 Insektenzellen verwendet (2.4.3.1). Nach drei Tagen wurde der virenhaltige Kulturüberstand geerntet, die infizierten Zellen weitere vier Tage mit frischem Medium inkubiert. Daran anschließend wurden die Zellen lysiert und lösliche sowie partikuläre Fraktion über SDS-PAGE, gefolgt von einer Immunoblotanalyse untersucht (Abbildung 14)

Diese erste Analyse zeigte, dass die mit dem Klon "1" kotransfizierten Sf9-Zellen ein Protein mit dem gesuchten Molekulargewicht exprimieren, welches mit dem Cβ2-spezifischen Antiserum reagiert. Die fragliche Bande zeigt sich in vergleichbarer Intensität sowohl in der löslichen als auch in der unlöslichen Fraktion. Darüber hinaus taucht die Proteinbande weder bei uninfizierten Sf9-Zellen, noch bei nur mit einem Transferplasmid (ohne Virus-DNA) oder einem Kontrollplasmid (pBlueBac4.5/CAT) kotransfizierten Zellen auf. Bei den mit Klon "5" kotransfizierten Zellen fehlt die Bande ebenfalls, vermutlich war hier die Kotransfektion nicht erfolgreich oder eventuell vorhandene rekombinante Viren wurden von Wildtyp-Viren überwachsen.

Eine massive Degradation des rekombinanten Proteins wie bei der bakteriellen Expression ist bei Klon "1" nicht zu beobachten. Dies deutete darauf hin, dass das Baculovirus-Expressionssystem für die Herstellung von rekombinantem Cβ2-Protein geeignet sein könnte.



Abbildung 14: Immunoblot-Analyse der Kotransfektion von Sf9-Zellen

Je 2 x 10⁶ Sf9 Zellen wurden mit Bac-N-BlueTM Virus-DNA und dem Transferplasmid pBlueBac4.5-C β 2 Klon1 bzw. Klon 5 oder dem Kontrollplasmid pBlueBac4.5-CAT transfiziert. Als Kontrolle wurden Sf9 Zellen auf identische Art und Weise nur mit einem Transferplasmid oder ohne DNA (mock) behandelt. Nach der Ernte des Kulturüberstandes wurde das Zellpellet in Lysepuffer resuspendiert und der Rohextrakt nach der Lyse durch Zentrifugation in lösliche (L) und partikuläre (P) Fraktion getrennt. Vergleichbare Proteinmengen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membran geblottet. Der Nachweis erfolgte mit dem C β -spezifischen anti C β (35-46) Antikörper.

3.4.3.2 Isolierung und Identifizierung rekombinanter Baculoviren

Da der virushaltige Kulturüberstand erfolgreich kotransfizierter Sf9-Zellen neben den rekombinanten AcNPV-Cβ2 Viren auch noch einen geringen Prozentsatz von Wildtyp-Viren enthält, welche einen Selektionsvorteil besitzen, ist es nötig, die Viren zu vereinzeln, um reine rekombinante Viren isolieren zu können. Dies geschieht mit Hilfe eines Plaque Assays (2.4.3.2). Da durch erfolgreiche homologe Rekombination entstandene virale Genome zusätzlich ein intaktes lacZ-Gen enthalten, wird die Auffindung dieser Viren durch die Umsetzung des Farbstoffes X-Gal erleichtert.

Auf diese Weise konnten 20 Isolate gewonnen werden, die zur Infektion weiterer Sf9-Zellen in 12-well Mikrotiterplatten verwendet wurden (siehe *Material und Methoden* (2.4.3.3)), um die Virenisolate weiter analysieren und vermehren zu können. Ein Teil des Kulturüberstandes aus dieser Infektion wurde zur Isolation viraler DNA verwendet (2.2.8), um über PCR die Integration des Cβ2 Gens in das virale Genom bestätigen zu können (2.4.3.3). Die Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte der viralen Isolate Nr. 1-12 zeigt in allen Fällen das bei erfolgter Integration des Cβ2-Gens zu erwartende 1,5 kB Produkt (Abbildung 15, Spuren 1-12) während man mit Wildtyp-Virus-DNA ein ca. 840 bp Produkt erhält (Abbildung 15, Spur "WT"). Diese 840 bp große Bande ist auch bei Isolat Nr.1 zu erkennen, dieses enthält also sowohl rekombinante als auch Wildtyp Viren. Eine Nur-Zell Kontrolle ohne Viren zeigt erwartungsgemäß kein PCR-Produkt (Spur "K").



Abbildung 15: Identifizierung rekombinanter viraler DNA über PCR

Die Virus-DNA wurde mit dem Easy-DNA Kit (Invitrogen, NL) aus 750 μ l Kulturüberstand infizierter Sf9-Zellen gewonnen. Mittels PCR wurden die zwischen den Baculovirus Forward (-44) und Reverse (+794) Primern liegenden Sequenzen amplifiziert. Diese Primer flankieren im WT-Virus das Polyhedrin Gen, das bei den rekombinanten Viren durch das C β 2-Gen ersetzt wurde. Als Kontrolle dienten uninfizierte Sf9 Zellen (K), Wildtyp-Virus DNA (WT) und das pBlueBac4.5-C β 2 Transferplasmid (C β 2). Erwartete Fragmentgrößen: Polyhedrin 834 bp, C β 2 1538 bp. M = Marker

Ergebnisse

Der verbleibende Kulturüberstand der Isolate 2-12 wurde als P-1 (Passage 1) Virusstock geerntet und lichtgeschützt bei 4°C gelagert. Die infizierten Sf9-Zellen wurden lysiert und die Expression des Cβ2-Proteins im Immunoblot überprüft. Die stärksten Signale ergaben sich bei den mit den Isolaten 4-7 infizierten Zellen (Daten nicht gezeigt), daher wurde der P-1 Virusstock dieser Isolate zur weiteren Virusamplifikation und der Gewinnung eines P-2 Virusstocks (2.4.3.3) verwendet.

3.4.3.3 Nachweis von Kinaseaktivität im Lysat infizierter Sf9 Zellen

Um vor der weiteren Arbeit mit den identifizierten rekombinanten Viren zu prüfen, ob tatsächlich aktives Protein exprimiert wird, wurden nach der Gewinnung des P-2 Virusstocks die mit den AcNPV-CB2 Isolaten Nr. 4-7 infizierten Sf9-Zellen lysiert. Diese Lysate wurden zusammen mit einem Lysat uninfizierter Sf9-Zellen im sogenannten Plättchentest (2.5.10) mit γ^{32} P-ATP als Kosubstrat auf ihre Phosphotransferaseaktivität gegenüber dem synthetischen Peptidsubstrat Kemptid getestet. Die Aminosäuresequenz dieses Heptapeptids (LRRASLG) enthält eine Konsensussequenz für Substrate der cAMP-abhängigen Proteinkinase, zwei basische Reste gefolgt von einem beliebigen Aminosäurerest und der Akzeptoraminosäure, in diesem Fall ein Serin. Als Kontrolle für Phosphorylierung durch zelleigene Kinasen dienten uninfizierte Sf9-Zellen, als Positivkontrolle wurde rekombinant exprimierte, affinitätsgereinigte Ca-Untereinheit eingesetzt. Die in das Peptidsubstrat inkorporierte Radioaktivität wurde mit einem Flüssigszintillationszähler bestimmt. Wie Abbildung 16 zeigt, war die Kinaseaktivität in den infizierten Zellen gegenüber der Kontrolle mit uninfizierten Sf9 Zellen um mehr als das Zehnfache erhöht. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass in den infizierten Zellen tatsächlich eine aktive Kinase mit Phosphorylierungsaktivität gegenüber Kemptid exprimiert wird. Da bereits zuvor in den Lysaten infizierter Zellen mit dem Cβ2spezifischen Antiserum ein 46 kDa Protein nachgewiesen wurde, handelt es sich dabei mit hoher Wahrscheinlichkeit um das CB2 Protein.



Abbildung 16: Die Phosphotransferaseaktivität im Lysat infizierter Sf9-Zellen ist stark erhöht

Mit den Virusisolaten Nr. 4-7 infizierte Sf9 Zellen wurden lysiert und jeweils 20 μ g Gesamtprotein in einem Kinaseassay mit 20 mM Kemptid und 0,5 mM ATP (~ 2 μ Ci) eingesetzt. Als Kontrolle diente das Lysat uninfizierter Sf9 Zellen (Sf9) bzw. 20 ng affinitätsgereinigte, rekombinante C α -Untereinheit (rC α). Die in das Peptidsubstrat inkorporierte Radioaktivität wurde im Flüssigszintillationszähler bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von Dreifachbestimmungen, normalisiert auf die Sf9-Kontrolle.

3.4.3.4 Rekombinantes Cβ2-Protein aus Sf9-Zellen bindet an PKI(5-24) Peptid

Der hitzestabile Proteinkinase-Inhibitor PKI ist ein sehr spezifischer Inhibitor der cAMP abhängigen Proteinkinase mit einer Inhibitionskonstanten im subnanomolaren Bereich (Ashby and Walsh, 1972). Das von ihm abgeleitete synthetische PKI(5-24) Peptid bindet ebenfalls mit hoher Affinität (Ki ~ 2 nM; Cheng et al.,1986) und wird für die Affinitätsreinigung von katalytischen Untereinheiten der PKA verwendet (Ohlsen and Uhler, 1989). Nachdem zuvor gezeigt wurde, dass mit rekombinanten Baculoviren infizierte Sf9 Zellen ein Protein von etwa 46 kDa exprimieren, welches im Immunoblot mit anti-C β 2 Serum angefärbt wird und dass zudem die Kinaseaktivität gegenüber dem Peptidsubstrat Kemptid in diesen Zellen stark erhöht ist, sollte nun überprüft werden, ob das rekombinante Protein an PKI(5-24)-Peptid bindet.

Zu diesem Zweck wurden Sf9 Zellen $(6 \times 10^6$ Zellen in 75 cm² Flaschen) mit 1 ml Virusstock infiziert und nach 3 Tagen bei 27°C lysiert. Ebenso wurde mit einer uninfizierten Kontrollpopulation verfahren. Die Lysate wurden anschließend einer PKI-Affinitätsreinigung im Batch-Verfahren unterzogen (2.5.8), die einzelnen Fraktionen gesammelt und Aliquots davon über SDS-PAGE analysiert. Die an das PKI-AffiGel gebundenen Proteine wurden mit SDS-Probenpuffer eluiert und ebenfalls im SDS-PAA Gel getrennt. Wie in Abbildung 17A zu sehen ist, konnte aus den mit rekombinanten Baculoviren infizierten Zellen ein Protein an das Affinitätsmaterial gebunden werden, dessen Größe den erwarteten 46 kDa des C β 2 Proteins entspricht (Spur 5). Das Protein konnte im Immunoblot mit dem Anti-PKA_{βcat} Antikörper angefärbt werden (Abbildung 17B), nicht jedoch mit dem anti-C α (35-46) Antikörper (Abbildung 17C, Spur 5). Die schwächere Bande unterhalb der Hauptproteinbande ist höchstwahrscheinlich ein N-terminales Abbauprodukt, da auch sie von dem gegen den C-Terminus gerichteten Antikörper erkannt wird. Bei der Affinitätschromatographie mit dem Lysat uninfizierter Sf9 Zellen konnte im Coomassie-gefärbten Gel kein Protein nachgewiesen werden, welches spezifisch an das PKI-Peptid gebunden hätte. Im Immunoblot tritt hier bei langer Exposition eine Bande auf (Abbildung 17D), bei der es sich möglicherweise um eine endogene katalytische Untereinheit der PKA handelt.



Abbildung 17: Rekombinantes C^β2-Protein aus Sf9-Zellen bindet an PKI-Peptid

Mit AcNPV-Cβ2 infizierte Sf9-Zellen wurden 3 Tage p.i. lysiert und einer PKI(5-24)-Affinitätschromatographie im Batch Verfahren unterzogen (2.5.8). Aliquots einzelner Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Als Kontrolle wurden nicht infizierte Sf9 Zellen identisch behandelt.

A, B, C: mit AcNPV-Cβ2 infizierte Sf9-Zellen, D: uninfizierte Zellen

A Coomassie-gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel **B**, **D**: Western-Blot, Nachweis mit anti-PKA β_{cat} **C**: Western Blot, Nachweis mit anti C α (35-46)

Spur 1: partikuläre Fraktion Spur 2: lösliche Fraktion Spur 3: Säulendurchlauf Spur 4: Waschfraktion Spur 5: Eluat, $C\alpha$: rekombinante C α -UE (0,5 µg) Sf9: Eluat aus Affinitätschromatographie uninfizierter Zellen, M: Größenstandard

Aufgrund der starken Konservierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase in der Evolution wäre es nicht unerwartet, dass der verwendete Antikörper auch eine Kreuzreaktion mit einer C-Untereinheit aus Insektenzellen zeigt. So weist z.B. die C-Untereinheit der PKA aus *Drosophila* (Kalderon and Rubin, 1988) 82% Identität und 89% Homologie in der Aminosäuresequenz sowohl zu C α als auch zur C β 1-Untereinheit aus Rindergewebe auf. Sollte es sich bei diesem Protein tatsächlich um endogene PKA der Insektenzellen handeln, wäre die Menge jedoch sehr gering und dürfte bei infizierten Zellen sogar noch geringer sein, da die Proteinbiosynthese der Wirtszelle nach der Infektion hauptsächlich virale Gene exprimiert.

Mit diesem Experiment konnte also gezeigt werden, dass sich das bereits im Bakterienlysat nachgewiesene rekombinante Protein über PKI-Affinitätschromatographie aus dem Lysat infizierter Sf9-Zellen reinigen lässt. Die MgATP-abhängige Bindung an das PKI-Peptid ist ein weiteres Charakteristikum von katalytischen Untereinheiten der PKA.

3.4.3.5 Mit rekombinanten Baculoviren infizierte Sf9-Zellen weisen eine veränderte Morphologie auf

Während der Inkubation der infizierten Sf9 Zellen änderte sich deren Morphologie auffallend im Vergleich zu uninfizierten Kontrollpopulationen. Üblicherweise vergrößert sich bei einer Infektion von Sf9 Zellen mit Baculoviren der Zellkern aufgrund der Akkumulation viraler Proteine (O'Reilly et al, 1992). Dieses Phänomen konnte auch bei den hier durchgeführten Expressionsstudien beobachtet werden. Darüber hinaus kam es bei einer großen Zahl von Zellen zur Ausbildung ausgeprägter Fortsätze (Abbildung 18). Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits von Cheley et al. (1992) bei der rekombinanten Expression einer katalytischen Untereinheit der PKA aus der Meeresschnecke *Aplysia* in Sf9 Insektenzellen gemacht. Cheley et al. konnten dies auf die Aktivität der exprimierten C-Untereinheit zurückführen.. Auch bei der Mikroinjektion von C-Untereinheiten in lebende Zellen wurde die Ausbildung ähnlicher Fortsätze beobachtet (Pepperkok et al., 2000, Lamb et al., 1989) und als Hinweis auf die Kinaseaktivität des mikroinjizierten Proteins gedeutet.

Es ist daher wahrscheinlich, dass in den C β 2-exprimierenden Zellen der gleiche oder ein ähnlicher Mechanismus für die Ausbildung der Fortsätze verantwortlich ist. Dies wäre ein weiterer Hinweis auf die Aktivität des Enzyms und könnte darauf hindeuten, dass C β 2 *in vivo* Funktionen von C α übernehmen kann.



Abbildung 18: Cβ2-exprimierende Sf9 Zellen weisen eine veränderte Morphologie auf

Uninfizierte Sf9 Zellen (A) und mit rekombinanten Baculoviren infizierte Zellen (B) wurden nach 48stündiger Inkubation bei 27°C mikroskopisch untersucht und fotografisch dokumentiert. Die im Text beschriebenen Fortsätze sind mit Pfeilköpfen markiert. Der nicht ausgefüllte Pfeilkopf markiert eine bereits lysierte Zelle.

3.4.3.6 Optimierung der Expression von Cβ2 in Sf9-Zellen

Nachdem durch die vorhergehenden Untersuchungen bestätigt worden war, dass C β 2 als intaktes, aktives Protein in Sf9 Zellen exprimiert werden kann, wurden im nächsten Schritt die Expressionsbedingungen optimiert. Zu diesem Zweck wurde zunächst der bereits vorhandene P-2 Virusstock weiter vermehrt (2.4.3.3), um einen P-3 Stock zu gewinnen, einen Virusstock mit hohem Titer, der für Expressionen im großen Maßstab verwendet werden kann. Die Bestimmung des Virustiters im Plaque-Assay ergab einen Wert von 7-8 × 10⁷ pfu/ml.

Die Expressionsbedingungen wurden über die Variation der sogenannten *Multiplicity of Infection (MOI)* durchgeführt, einer Zahl, die angibt, wie viele Viren pro Zelle bei der Infektion eingesetzt werden. Zunächst wurden MOIs von 5 und 10 getestet, wie unter *Material und Methoden* (2.4.3.4) beschrieben. Die im Abstand von jeweils 24 h entnommenen Proben von Kulturüberstand und Sf9 Zellen wurden über SDS-PAGE und Western-Blotting auf die Expression des Cβ2-Proteins hin untersucht (Abbildung 19). Bereits nach 48 h war das Cβ2-Protein im Zelllysat bei beiden getesteten MOIs deutlich nachweisbar (Spur 2). Zum selben Zeitpunkt ließ sich das Protein auch im Kulturüberstand nachweisen, was für eine bereits beginnende Lyse der Zellen spricht. Nach 72 h (Spur 3) scheint der Höhepunkt der Expression überschritten zu sein, danach nimmt die Menge an nachweisbarem Cβ2 Protein im Zelllysat wieder ab, während sie im Kulturüberstand noch leicht zunimmt (MOI 5) bzw. konstant bleibt (MOI 10). Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Experimenten konnte jedoch nicht festgestellt werden. Bei der höhermolekularen Bande, die in den Kulturüberständen zu sehen ist, handelt es sich um das im Kulturmedium enthaltene BSA. Ein fast identisches Expressionsprofil zeigte sich bei weiteren Untersuchungen, bei denen MOIs von 0,5 und 1 verwendet wurden, wobei die Gesamtmenge an rekombinantem Protein aber etwas geringer war. Die Proteinausbeute scheint daher nur in geringem Maße von der MOI beeinflusst zu werden. Der Höhepunkt der Expression lag unabhängig davon zwischen 48 und 72 h.



Abbildung 19: Test verschiedener MOIs zur Optimierung der C_β2-Expression in Sf9 Zellen

In den einzelnen Vertiefungen von 6-well Zellkulturschalen wurden je 10⁶ Sf9-Zellen ausgesät und mit Viren in der angegebenen MOI infiziert. Eine Kultur blieb jeweils als Negativkontrolle uninfiziert und wurde nach 48 h geerntet. Im Abstand von je 24 h wurden die Zellen und der Kulturüberstand aus einer Vertiefung geerntet. Nach Entnahme aller Proben wurden diese über SDS-PAGE und Immunoblot mit dem Anti-PKA_{Beat} Antikörper auf die Expression des rekombinanten Proteins hin untersucht.

Die Abbildung zeigt in der oberen Hälfte die Analyse der mit einer MOI = 5 infizierten Zellen, unten die mit MOI=10 infizierten. Links sind jeweils die Kulturüberstände aufgetragen, rechts die Lysate der Sf9-Zellen. "K" bezeichnet die Negativkontrolle, die Zahlen über, bzw. unter den Spuren geben an, wann die Proben entnommen wurden (Tage nach Infektion). Die Position von BSA in den Kulturüberständen und des C β 2-Proteins sind angegeben.

3.4.4 PKI(5-24)-Affinitätsreinigung von rekombinant exprimiertem Cβ2

Die Voraussetzung für weitergehende Untersuchungen des Cβ2-Proteins war es, ausreichende Mengen des Enzyms für eine biochemische Charakterisierung zu gewinnen. Nach der Optimierung der Expressionsbedingungen wurden daher Sf9 Zellen in großem Maßstab mit rekombinanten Baculoviren aus dem P-3 Virusstock infiziert. Dies wurde sowohl mit adhärent wachsenden Zellen, als auch mit Zellen in Suspensionskultur (2.4.3.5) durchgeführt, mit vergleichbaren Ergebnissen. Aufgrund der leichteren Handhabung der Suspensionskultur, sowie des größeren Kulturvolumens und der höheren Zelldichte wurde die Suspensionskultur bevorzugt verwendet. Dabei erwies es sich als wichtig, ein Magnetrührgerät mit externem Motor und geringer Wärmeabgabe zu verwenden, da ansonsten die Wärmeentwicklung zu einer Schädigung der Zellen führte.

Abbildung 20 zeigt ein Coomassie gefärbtes Gel und einen Immunoblot der Fraktionen aus einer typischen PKI(5-24) Affinitätschromatographie Cβ2-exprimierender Sf9 Zellen.

Die Zellen wurden mit einer MOI von 5 infiziert und nach 72 h bei 27°C geerntet und lysiert. Die Affinitätschromatographie wurde durchgeführt wie in Abschnitt 2.5.8 beschrieben. Die einzelnen Fraktionen wurden gesammelt und über SDS-PAGE (Abbildung 20A) und im Immunoblot (Abbildung 20B) analysiert.

Wie bereits im Minibatch-Verfahren (3.4.3.4) bindet das lösliche Protein sehr effizient an die PKI(5-24)-Affinitätssäule; im Säulendurchlauf sind nur geringe Mengen des 46 kDa Proteins nachzuweisen (Abbildung 20B, Spur 2), in den Waschfraktionen liegt die Menge unterhalb der Detektionsgrenze (Abbildung 20B, Spur 3 und 4). Das gebundene Protein lässt sich mit 200 mM Arginin in 50 mM Tris-Puffer (pH 7,4) eluieren (Abbildung 20A, Spur 6+7, 20 B, Spur 5-9). Im Elutionsverhalten konnte kein Unterschied zu den beiden anderen in dieser Arbeit verwendeten C-Untereinheiten, C α und C β 1 (vgl. 3.5.2) festgestellt werden. Das Auftreten eines Abbauproduktes mit einem geschätzten Molekulargewicht von 44 kDa ließ sich nie ganz vermeiden, konnte durch den Einsatz des Proteaseinhibitors E-64 im Lysat jedoch vermindert werden. Die Proteinausbeute lag im allgemeinen bei 0,25 bis 0,5 mg/l Sf9 Zellen in Suspensionskultur.

Damit ist es erstmals gelungen, die C β 2-Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase als lösliches und aktives Protein zu exprimieren und in für eine biochemische Charakterisierung ausreichender Menge zu reinigen.



Abbildung 20A: PKI(5-24) Affinitätschromatographie mit Lysat aus Cβ2 exprimierenden Sf9 Insektenzellen

Cβ2 exprimierende Sf9 Zellen wurden 72 h nach der Infektion mit dem rekombinanten Virus lysiert. Die cytoplasmatische Fraktion wurde anschließend einer PKI(5-24) Affinitätschromatographie unterzogen. Aliquots ausgewählter Fraktionen wurden über SDS-PAGE mit anschließender Coomassie Färbung analysiert. *Spur 1*: partikuläre Fraktion; *Spur 2*: cytoplasmatische Fraktion; *Spur 3*: Säulendurchlauf; *Spur 4*: 1. Waschfraktion (TMN 50 Puffer); *Spur 5*: 2. Waschfraktion (TMN 250 Puffer); *Spur 6*: 2. Elutionsfraktion; *Spur 7*: 3. Elutionsfraktion; *Spur 8*: 0,5 ng rekombinantes Cα-Protein; M: Größenstandard. Es wurden die Elutionsfraktionen analysiert, welche im Bradford-Assay den höchsten Proteingehalt aufwiesen.



Abbildung 20B: Western Blot einer PKI(5-24)Affinitätschromatographie aus Cβ2-exprimierenden Sf9 Insektenzellen

Einzelne Fraktionen aus der PKI(5-24)-Affinitätschromatographie wurden über SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mit dem anti-PKA β_{cat} -Antikörper, gefolgt von einem HRPO-gekoppelten Ziege anti-Kaninchen IgG.

Spur 1: cytoplasmatische Fraktion, *Spur 2:* Säulendurchlauf, *Spur 3:* Waschfraktion 1 (TMN 50 Puffer) *Spur 4:* Waschfraktion 2 (TMN 250 Puffer), *Spuren 5-9:* Elutionsfraktionen 1-5, *Spur 10:* rekombinantes Cα-Protein

3.4.5 Stabilität und Lagerung des Cβ2-Proteins

Die C α -Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase wird im allgemeinen bei 4°C gelagert, da tiefere Temperaturen einen drastischen Aktivitätsverlust zur Folge haben. Eine Ausnahme stellt die Lagerung in Kryopuffer dar (Prorok und Lawrence, 1988), der das Einfrieren in flüssigem Stickstoff erlaubt. Dies erwies sich für C β 2 jedoch als nicht durchführbar. Bereits beim Pufferaustausch entweder über Dialyse oder in Centricon-30 Konzentratoren ging ein Großteil des gereinigten Proteins durch Präzipitation oder Adsorption an die Dialyse- bzw. Konzentratorenmembran verloren, wie ein Ausspülen der Membran mit SDS-Probenpuffer und anschließende SDS-PAGE der Probe zeigte (Daten nicht gezeigt).

Auch die Verwendung anderer Puffersysteme (Phosphatpuffer, Tris, MOPS) in Kombination mit unterschiedlichen Zusätzen wie Mg^{2+} , DTT oder geringen Mengen Arginin konnte die Präzipitation des Proteins beim Pufferwechsel über Dialyse oder Centricon-Konzentratoren nicht verhindern. Bei Verwendung von PD10 Gelfiltrationssäulchen gab es beim Austauschvorgang zwar kaum Verluste, allerdings präzipitierte ein Großteil des C β 2-Proteins anschließend – abhängig vom verwendeten Puffer – in einem Zeitraum von wenigen Minuten bis 24 Stunden. Die Verwendung von Hochsalzpuffern (>500 mM NaCl) konnte die Verluste beim Pufferaustausch zwar verringern, diese boten aber gegenüber dem auszutauschenden Puffer keine Vorteile.

Aufgrund dieses Phänomens wurde das gereinigte Protein für die Lagerung im Elutionspuffer belassen, in dem es für 6-8 Wochen stabil gelagert werden konnte. Für die Anwendungen, bei denen sich die Pufferkomponenten störend auswirkten, z.B. bei der Massenspektrometrie und den Oberflächenplasmonresonanz-Messungen, wurde das Protein unmittelbar vor der Verwendung umgepuffert, um den Verlust durch Präzipitation so gering wie möglich zu halten. Diese Messungen waren aufgrund der geringen benötigten Proteinkonzentration gut durchführbar. Bei Untersuchungen, wie z.B. der isoelektrischen Fokussierung, die hohe Proteinkonzentrationen bei Niedrigsalzbedingungen voraussetzt, fiel das Protein jedoch bereits am Auftragspunkt aus.

3.4.6 Identifizierung des affinitätsgereinigten Proteins über ESI-MS

Nachdem bereits zuvor die Identität des rekombinant exprimierten Proteins als Cβ2 durch die Phosphotransferaseaktivität, im Western-Blot mit spezifischen Antikörpern und durch die Bindung an PKI bestätigt werden konnte, sollte durch massenspektrometrische Untersuchung das Molekulargewicht des Proteins überprüft werden, um Modifizierungen, falls vorhanden, erkennen zu können. Diese Messungen wurden freundlicherweise von Herrn Andreas Schlosser, Abteilung Zentrale Spektroskopie am DKFZ Heidelberg durchgeführt. Abbildung 21 zeigt den relevanten Ausschnitt eines ESI-MS Spektrums des affinitätsgereinigten C β 2 Proteins. Das Spektrum zeigt zwei diskrete Peaks bei 46178,9 und 46257,9 Da. Diese Werte entsprechen einer einfach und einer zweifach phosphorylierten Form von C β 2 deren theoretisches Molekulargewicht 46188 bzw. 46268 Da beträgt. Neben der Phosphorylierung treten also keine weiteren Modifikationen auf.



Abbildung 21: ESI-MS Spektrum des affinitätsgereinigten CB2 Proteins

Die Abbildung zeigt den relevanten Ausschnitt eines ESI-MS Spektrums von affinitätsgereinigtem C β 2-Protein. Die Messung erfolgte nach Entsalzen der Probe mit C₁₈.ZipTips (Millipore, Eschborn) an einem Q-TOF II (Micromass, UK) im Positivmodus gemessen. Gezeigt ist der Bereich von 45500 bis 47000 Da, die relative Intensität ist in Bezug auf den höchsten Peak angegeben.

Untersuchungen am nativen Enzym aus Rinderherz hatten bereits bestätigt, dass das Enzym *in vivo* am Threoninrest 244 und Serinrest 385 phosphoryliert ist (Thullner et al. 2000), was den aus der C α - Untereinheit bekannten Phosphorylierungsstellen Threonin 197 bzw. Serin 338 entspricht. Massenspektrometrische Untersuchungen tryptischer Spaltpeptide von C β 2 konnten die Phosphorylierung am Serinrest 385 bestätigen. Das tryptische Fragment, welches Threonin 244 enthielt, konnte nicht detektiert werden. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass dieser Rest auch im rekombinanten Enzym phosphoryliert ist, da – in Analogie zu C α (Steinberg et al. 1993, Girod et al. 1996) - nur so eine katalytisch aktive Konformation erreicht werden kann, welche eine notwendige Voraussetzung für die PKI(5-24) Affinitätschromatographie darstellt.

Darüber hinaus ist auch in der C α -Untereinheit das tryptische Fragment, welches den phosphorylierten Threoninrest 197 enthält, aufgrund schlechter Spaltbarkeit durch Trypsin nur schwer nachweisbar (A. Schlosser, persönliche Mitteilung).

Die massenspektrometrischen Daten bestätigen über das korrekte Molekulargewicht die Identität des C β 2-Proteins. Neben der Phosphorylierung sind dabei keine weiteren Modifikationen zu beobachten. Es treten im Gegensatz zur Expression von C α und C β 1 in *E. coli* (Herberg et al., 1993; diese Arbeit, Abschnitt 3.5.4) keine hyperphosphorylierten Formen des Proteins auf, ungewöhnlich ist jedoch das Auftreten einer nur einfach phosphorylierten Form.

3.5 Rekombinante Expression von Cβ1

3.5.1 Expression von C β 1 mit dem pET-Expressionssystem

Für die biochemische Charakterisierung der Cβ2-Untereinheit der PKA waren insbesondere die Unterschiede zu der Spleißvariante Cβ1 von Interesse, da nur so auf eventuelle Funktionen des Cβ2-spezifischen N-Terminus geschlossen werden konnte. Daher musste zunächst auch die rekombinante Expression von Cβ1 etabliert werden. Bislang konnte nur die C α Untereinheit routinemäßig in *E. coli* exprimiert werden (Slice and Taylor, 1989). Gosse et al. (1994) berichten, dass die Expression der Cβ1-Untereinheit aus CHO-Zellen in *E. coli* BL21(DE3) Δcya in vollständig unlöslichem Protein resultierte. Bei einer vergleichenden Studie zwischen murinem C α und C β 1 wurden beide Isoformen in NIH3T3-Fibroblasten der Maus exprimiert, wodurch geringe Mengen an aktivem Protein gewonnen werden konnten (Uhler and McKnight, 1987). In einer anderen Studie konnten Gamm et al. (1996) das C β 1-Protein erfolgreich in BL21(DE3) LysS exprimieren, wenn auch nur in relativ geringen Mengen.

Zunächst wurde im Rahmen dieser Arbeit auch für C β 1 die Expression in BL21(DE3) Zellen untersucht. Eine bovine C β 1-cDNA lag bereits im eukaryotischen Expressionsvektor pSG5 vor. Die Klonierung in den Expressionsvektor pET28b(+) erfolgte wie unter *Material und Methoden* (2.2.15.4) beschrieben. Nach der Identifizierung positiver Klone und der Bestätigung durch Sequenzierung wurde zunächst im kleinen Maßstab mit 3 ml Kulturen Expression und Löslichkeit des Genproduktes überprüft. Abbildung 22 zeigt ein Coomassiegefärbtes Gel mit den Lysaten aus einer Testexpression, sowie einen Immunoblot mit identischem Probenauftrag, bei dem das Cβ1-Protein mit dem anti PKA_{βcat} Antikörper detektiert wurde. Sowohl bei nichtinduzierten als auch bei mit IPTG induzierten Kulturen tritt in der löslichen und in der unlöslichen Proteinfraktion ein immunreaktives Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 40 kDa auf, was der erwarteten Größe von Cβ1 entspricht (Abbildung 22, rechte Seite). Die Menge an immunreaktivem Protein nimmt bei den induzierten Kulturen gegenüber den nichtinduzierten noch deutlich zu. Bei den Banden geringeren Molekulargewichts, die vor allem in der unlöslichen Proteinfraktion (Spur "P") auftreten, handelt es sich vermutlich um Abbauprodukte vom N-Terminus her. Offensichtlich befindet sich der größere Anteil des Proteins in der unlöslichen Fraktion, dennoch scheint ein signifikanter Anteil löslich zu sein (Spur "L"), im Gegensatz zu den oben erwähnten Studien (Gosse et al., 1994), obwohl in diesen ein fast identisches Expressionssystem für C-Untereinheiten aus CHO-Zellen verwendet wird.



Abbildung 22: Testexpression des pET28b-Cβ1 Plasmides in E. coli BL21(DE3)

3 ml Kulturen von *E. coli* BL21(DE3) Zellen, die mit dem pET28b-C β 1 Plasmid transformiert waren, wurden bei 30°C in der logarithmischen Wachstumsphase mit 1mM IPTG induziert (+) oder ohne Induktion weiter inkubiert (-). Nach 3 h wurden die Bakterienzellen geerntet und lysiert. Aliquots der löslichen (L) und partikulären (P) Fraktion wurden mittels SDS-PAGE mit anschließender Coomassie Färbung (linke Seite) und Western-Blot (rechte Seite) analysiert. Der Nachweis im Western-Blot erfolgte mit dem anti-PKA β_{cat} Antikörper und einem Ziege anti-Kaninchen IgG Antikörper.

Dem Coomassie-gefärbten Gel nach zu urteilen (Abbildung 22, linke Seite), war die Expressionsrate unter den gewählten Bedingungen relativ gering, da keine prominente Bande nach der Induktion mit IPTG zu erkennen war. Die Tatsache, dass auch im nichtinduzierten

Zustand eine immunreaktive Bande beobachtet wurde, deutet auf eine basale Expression des C β 1-Gens in den *E. coli* Zellen hin; dies wurde sehr ähnlich bereits bei der bakteriellen Expression von C β 2 beobachtet.

3.5.2 PKI(5-24) Affinitätsreinigung von Cβ1

Nachdem sich hatte, dass C\u00df1 im Gegensatz zu C\u00ff2 als lösliches Protein in E. coli exprimiert werden kann, wurde anschließend die Expression im größeren Maßstab überprüft und das Bakterienlysat einer PKI(5-24) Affinitätschromatographie unterzogen. Die Expressionstemperatur wurde für diese Untersuchungen auf 24°C abgesenkt, da auch die Löslichkeit rekombinant exprimierter Ca-Untereinheit in E. coli durch niedrigere Expressionstemperatur erhöht werden kann (Slice and Taylor, 1989). Wie das Coomassie gefärbte Gel in Abbildung 23 zeigt, konnte die Expressionsrate im Vergleich zur Expression bei 30°C (Abbildung 22) deutlich gesteigert werden. Nach der Induktion der Expression tritt, verglichen mit der uninduzierten Kultur, eine prominente Bande im Bereich von 40 kDa auf (Abbildung 23, Spur 1 und 2). Über die Chromatographie mit einer PKI(5-24) Affinitätsmatrix konnte das rekombinant exprimierte Protein selektiv gereinigt werden (Spur 7-12). Ein Teil des exprimierten Cβ1-Proteins ist auch in den Waschfraktion zu finden (Spur 5 und 6), dies ist vermutlich auf eine Überladung der Chromatographie-Säule aufgrund der hohen Expressionsrate zurückzuführen. Daher rühren vermutlich auch die geringen Verunreinigungen der Elutionsfraktionen, die bei späteren Affinitätsreinigungen, bei denen größere Säulenvolumina eingesetzt wurden, nicht auftraten.

Das Auftreten eines Abbauproduktes ließ sich trotz des Einsatzes von Proteaseinhibitoren während der Affinitätschromatographie nicht ganz vermeiden. Da der Anteil des Abbauproduktes im Vergleich zum intakten C β 1-Protein verschwindend gering war, konnte dies für die durchzuführenden Untersuchungen als vernachlässigbar angesehen werden.

Die hier beschriebene Methode erlaubt die routinemäßige Expression und Reinigung großer Mengen der C β 1-Untereinheit, was bislang nur für die C α -Untereinheit etabliert war. Damit ist eine weitere wichtige Voraussetzung für die vergleichende Charakterisierung der C-Untereinheiten erfüllt.

86



Abbildung 23: PKI(5-24)-Affinitätschromatographie mit Lysat aus Cβ1 exprimierenden *E. coli* BL21(DE3)

Zwei 1 Liter Kulturen von mit pET28b-C β 1 transformierten *E. coli* BL21(DE3) wurden in der logarithmischen Wachstumsphase bei 24°C mit 0,1 mM IPTG induziert. Nach 16 h wurden die Bakterienzellen geerntet und lysiert, das Lysat wurde anschließend einer PKI(5-24)-Affinitätschromatographie (2.5.8) unterzogen. Verschiedene Fraktionen wurden anschließend über SDS-PAGE analysiert. *Spur 1*: Gesamtzellextrakt uninduzierte Kultur, *Spur 2*: Gesamtzellextrakt induzierte Kultur, *Spur 3*: cytoplasmatische Fraktion, *Spur 4*: Säulendurchlauf, *Spur 5*: Waschfraktion 1 (TMN 50 Puffer), *Spur 6*: Waschfraktion 2 (TMN 250 Puffer), *Spur 7-12*: Elutionsfraktionen 1-6, *M*: Größenstandard, *Ca*: rekombinantes C α -Protein (0,5 µg)

3.5.3 Stabilität und Lagerung des Cβ1 Proteins

Bei der Lagerung des rekombinanten C β 1-Proteins traten ähnliche Probleme auf, wie sie bereits bei C β 2 beobachtet wurden (3.4.5), wenn auch nicht ganz so ausgeprägt. Die Tendenz des Proteins, bei einem Austausch des Elutionspuffers zu präzipitieren, war jedoch immer noch sehr stark, so dass die Lagerung –auch aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit - wie bei C β 2 im Arginin-Elutionspuffer bei 4°C durchgeführt wurde. Die C β 1 Untereinheit konnte unter diesen Bedingungen für mindestens 6 Wochen ohne wesentlichen Aktivitätsverlust verwendet werden.

3.5.4 Massenspektrometrische Untersuchungen des Cβ1 Proteins

Im Gegensatz zu C β 2 (3.4.6) war die C β 1-Untereinheit der massenspektrometrischen Untersuchung des Gesamtproteins nur schwer zugänglich. Die durchgeführten ESI-MS Messungen konnten zwar bestätigen, dass das rekombinante Protein im Bereich des errechneten Molekulargewichts von 40623 Da für die zweifach phosphorylierte Form liegt, eine genauere Analyse war jedoch aufgrund des Auftretens mehrerer Artefaktpeaks, die auf die Bildung von Ameisensäureaddukten bei der Probenbehandlung hindeuteten, nicht möglich.

Die Untersuchung tryptischer Peptide des Proteins konnte dagegen die Identität des Proteins als C β 1 bestätigen (A. Schlosser, Zentrale Spektroskopie, DKFZ). Darüber hinaus konnten mehrere Phosphorylierungsstellen identifiziert werden. Aus der bakteriellen Expression des C α -Proteins ist bekannt, dass neben der essentiellen Phosphorylierung von Threonin 197 und der von Serin 338 auch der Serinrest an Position 10 sowie an Position 139 autophosphoryliert werden (Toner-Webb et al., 1992). Diese Phosphorylierungsstellen konnten auch bei C β 1 nachgewiesen werden, darüber hinaus trat jedoch ein zweifach phosphoryliertes tryptisches Peptid auf, das bei C α nicht zu beobachten ist. Anhand seiner Molekülmasse konnte das Peptid eindeutig identifiziert werden, es umfasst die Aminosäurereste 318-342, und damit auch die bereits bekannte Phosphorylierungsstelle an Ser338. Bei der zweiten, C β 1spezifischen Phosphorylierungsstelle muss es sich um Ser321 handeln, da nur dieser Serinrest ebenfalls innerhalb einer PKA-Konsensus-Sequenz liegt (K/R –X(X)-S/T). Die C α -Untereinheit trägt an dieser Stelle einen Prolinrest (Abbildung 24), ansonsten sind beide Peptide bei C α und C β identisch.

Abbildung 24: Cβ-spezifische Autophosphorylierung am Serinrest 321

Gezeigt ist die Sequenz des doppelt phosphorylierten tryptischen C β 1-Peptids (s. Text) und die entsprechende Sequenz in der C α -Untereinheit. Phosphorylierte Serinreste sind fett hervorgehoben, die Position des Restes im Protein ist darüber angegeben. C α trägt an Position 321 ein Prolin anstelle des bei C β 1 phosphorylierten Serins.

Die hier erhobenen massenspektrometrischen Daten bestätigen die Identität des rekombinant exprimierten Proteins als C β 1 und zeigen, dass das Protein bei der Expression in *E. coli* ebenso autophosphoryliert wird wie die C α -Untereinheit, wobei für C β 1 eine zusätzliche Autophosphorylierungsstelle identifiziert wurde, die aufgrund eines Aminosäureaustauschs in C α nicht vorkommt.

3.6 Vergleichende biochemische Charakterisierung der rekombinanten C β -Untereinheiten

3.6.1 Michaelis-Menten Kinetik mit Kemptid und ATP als Substrat

Um zu überprüfen, ob die Unterschiede in den N-Termini der rekombinant exprimierten Cβ-Untereinheiten einen Einfluss auf die Kinetik der Phosphorylierungsreaktion haben, wurden zunächst die Michaelis-Konstanten für das Peptidsubstrat Kemptid sowie den Kofaktor ATP in einem radioaktiven Kinase-Assay (2.5.10) bestimmt. Zur Bestimmung des K_M-Wertes für Kemptid wurde eine ATP-Konzentration von 250 μ M gewählt und die Peptidkonzentration zwischen 2,5 und 100 μ M variiert. Der K_M-Wert für ATP wurde bei einer konstanten Kemptidkonzentration von 200 μ M und variablen ATP-Konzentrationen von 1-100 μ M bestimmt (Abbildung 25) A und B zeigen die Auftragung der Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Kemptid- bzw. ATP-Konzentration aus zwei repräsentativen Experimenten. In Tabelle 2 sind die gemittelten K_M-Werte und spezifischen Aktivitäten aus jeweils drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst.

Während sich der K_M-Wert für ATP der C β -Isoformen nur geringfügig unterscheidet, war der apparente K_M-Wert für Kemptid bei der C β 1-Untereinheit unter den gewählten Bedingungen etwa doppelt so hoch wie bei C β 2. Auch die spezifische Aktivität des C β 1-Proteins war etwa doppelt so hoch wie die für C β 2 ermittelte. Verglichen mit der Hauptisoform C α wiesen beide C β -Isoformen sowohl höhere K_M-Werte für Kemptid und ATP, als auch eine höhere spezifische Aktivität auf. Dies ließe darauf schließen, dass die C α -Untereinheit mit höherer Affinität bindet, aber eine geringere Umsatzrate hat.

Der Unterschied im apparenten K_M -Wert für Kemptid bei den C β -Isoformen ist bemerkenswert, da diese bis auf den N-Terminus identisch sind. Da der N-Terminus auf der gegenüberliegenden Seite der Substratbindungsstelle des Enzyms liegt (vgl. Abbildung 2) ist es fraglich, ob er einen direkten Einfluss auf die Bindung eines kleinen Substratpeptides wie Kemptid nehmen kann. Da bis auf die mögliche Bildung einer amphiphilen Helix (Wiemann et al., 1991) bislang nichts über die Faltung der 62 Aminosäurereste des N-Terminus bekannt ist, kann diese Möglichkeit jedoch nicht ausgeschlossen werden. Denkbar ist auch, dass durch den C β 2-spezifischen N-Terminus die Konformation des aktiven Zentrums der Kinase und dadurch auch die Substratbindungsstelle beeinflusst wird.



Abbildung 25: Bestimmung der Michaelis Konstanten der rekombinanten Cβ-Untereinheiten für Kemptid und ATP

Gereinigte rekombinante C-Untereinheiten wurden in einem radioaktiven Proteinkinase-Assay eingesetzt wie in *Material und Methoden* beschrieben. Die Bestimmung des $K_{M (Kemptid)}$ (A) erfolgte bei einer sättigenden ATP-Konzentration von 250 μ M, für die Ermittlung des $K_{M (ATP)}$ (B) wurden 200 μ M Kemptid eingesetzt. Die gemessenen Anfangsgeschwindigkeiten wurden gegen die Substratkonzentration aufgetragen, die Datenpunkte stellen die Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen \pm Standardabweichung dar. Die Daten wurden unter Annahme einer Michaelis-Menten Kinetik mit der Software *GraFit 3.0* gefittet.

	K _{M (Kemptid)} [μM]	Κ _{M (ATP)} [μM]	spezifische Aktivität [μmol × (min × mg) ⁻¹]
Cβ1	$15,2 \pm 1,8$	$11,5 \pm 2,2$	$7,3 \pm 1,3$
Cβ2	$7,2 \pm 0,9$	$8,5 \pm 0,8$	$3,9 \pm 0,7$
Cα	$4,3 \pm 0,3$	$4,8 \pm 0,6$	1,8 ± 0,3

Tabelle 2: Apparente kinetische Konstanten der rekombinanten C-Untereinheiten für Kemptid und ATP

Ergebnisse

3.6.2 Inhibition der Phosphotransferaseaktivität durch PKI(5-24) Peptid

Das PKI-Peptid, welches die Aminosäuren 5-24 des hitzestabilen Proteinkinase-Inhibitors umfasst, ist ein starker und selektiver Pseudosubstrat-Inhibitor der katalytischen Untereinheiten der cAMP-abhängigen Proteinkinase (Cheng et al., 1986; Glass et al, 1989). Um die Inhibition der rekombinanten C β -Untereinheiten durch das PKI(5-24) Peptid näher zu untersuchen, wurden in einem Proteinkinase-Assay mit Kemptid als Substrat steigende Mengen des Inhibitorpeptids eingesetzt. In Abbildung 26 ist die gemessene

Phosphotransferaseaktivität gegen die Inhibitorkonzentration aufgetragen. Der Verlauf der

Inhibition ist dabei für C\u03b31 und C\u03b32 im Rahmen der Messgenauigkeit fast identisch.

Aus der Inhibitorkonzentration, die unter den gewählten Bedingungen eine halbmaximale Hemmung ergibt, lässt sich nach Cheng und Prusoff (1973) die inhibitorische Konstante K_i abschätzen (wenn der K_M-Wert des Substrats bekannt ist). Der ermittelte Wert lag für beide Isoformen im Bereich von 2-4 nM und ist damit in guter Übereinstimmung mit dem für C α aus der Literatur bekannten Wert von 2,3 nM (Glass et al, 1989).



Abbildung 26: Inhibition der Phosphotransferaseaktivität der Cβ-Untereinheiten durch PKI(5-24)

Der radioaktive Proteinkinase-Assay wurde durchgeführt wie zuvor, jedoch wurde das Inhibitorpeptid in variierenden Konzentrationen (1 nM – 1 μ M) in den Reaktionsansatz gegeben und für 5 min bei 30°C inkubiert bevor die Reaktion durch Zugabe von ATP (200 μ M, 2 μ Ci/ml) gestartet wurde. Die in das Substrat eingebaute Aktivität wurde im Flüssigszintillationszähler bestimmt. Die Aktivität in Abwesenheit des Inhibitorpeptids wurde als 100% angenommen. Die Auswertung erfolgte mit der Software *GraphPad Prism 3.0 (Demo-Version)*.

Diese Daten zeigen, dass sowohl C β 1 als auch C β 2 der Inhibition durch das PKI(5-24)-Peptid unterliegen, wobei sich zwischen C β 1 und C β 2 keine signifikanten Unterschiede im Verlauf der Inhibition zeigten. Die unterschiedlichen N-Termini scheinen folglich keinen Einfluss auf die Affinität der Proteine zum PKI-Peptid zu nehmen.

3.6.3 Inhibition der Phosphotransferaseaktivität durch die regulatorische Untereinheit RIIα

Das PKA-Holoenzym setzt sich aus zwei regulatorischen und zwei katalytischen Untereinheiten zusammen, wobei die regulatorischen Untereinheiten als Inhibitoren wirken. Um diese Interaktion zu untersuchen, wurde der radioaktive Proteinkinase-Assay mit C β 1 und C β 2 in Gegenwart steigender Mengen von rekombinanter RII α -Untereinheit durchgeführt, die freundlicherweise von Dr. Friedrich W. Herberg (Ruhr-Universität Bochum) zur Verfügung gestellt wurde. Wie schon bei der Inhibition durch das PKI(5-24) Peptid ergab sich ein fast identischer Verlauf der Inhibition der Kemptidphosphorylierung durch RII α für C β 1 und C β 2 (Abbildung 27).



Abbildung 27: Inhibition der Phosphotransferaseaktivität der Cβ-Untereinheiten durch RIIα

Die Phosphorylierung des Peptidsubstrates Kemptid wurde in der Gegenwart steigender Mengen der regulatorischen Untereinheit RII α untersucht. Die regulatorische Untereinheit wurde in Gegenwart von ATP 5 min bei 30°C mit 5-7 nM der jeweiligen katalytischen Untereinheit inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 100 μ M Kemptid gestartet. Die in das Substrat eingebaute Aktivität wurde im Flüssigszintillationszähler bestimmt. Angegeben ist die prozentuale Aktivität in Abhängigkeit vom molaren Verhältnis R:C. Die Aktivität in Abwesenheit von RII α wurde dabei als 100% angenommen.

Der Kurvenverlauf legt eine stöchiometrische Inhibition nahe, was mit der erwarteten Holoenzymbildung aus je zwei regulatorischen und zwei katalytischen Untereinheiten übereinstimmt. Die beobachtete geringe Abweichung von der 1:1 Stöchiometrie (50 % Hemmung bei R/C = 0,65) ist möglicherweise auf inaktive R-Untereinheiten in der Präparation zurückzuführen.

Damit konnte gezeigt werden, dass C β 2 ebenso wie C β 1 der Regulation durch die RII α -Untereinheit unterliegt. Die Interaktion von C- und R-Untereinheiten wurde im folgenden genauer untersucht.

3.6.4 Interaktionsmessungen zwischen R- und C-Untereinheiten mittels Oberflächenplasmonresonanz (SPR)

Eine genaue Messung der Interaktion zwischen Proteinen in Echtzeit ist mit der Methode der Oberflächenplasmonresonanz möglich (2.5.11). Diese Methode wurde herangezogen, um die Interaktion der C α , C β 1- und C β 2-Untereinheit mit den verschiedenen R-Untereinheiten zu untersuchen. Diese Messungen wurden an der Ruhr-Universität Bochum in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Friedrich W. Herberg durchgeführt. Für die Messung wird einer der Interaktionspartner (Ligand) auf der Sensoroberfläche immobilisiert, während der zweite Interaktionspartner (Analyt) in der Flussphase darübergeleitet wird. Da die C β -Untereinheiten als Liganden zu immobilisieren. Da die Kopplung über primäre Amingruppen erfolgt, war auch dabei ein Pufferaustausch nötig, da der Elutionspuffer, in dem die C β -Untereinheiten gelagert wurden, mit Tris und Arginin einen hohen Anteil primärer Amine aufweist. Es erwies sich als äußerst wichtig, die Proteine nach dem Pufferaustausch möglichst schnell zu immobilisieren, da ansonsten bereits Verluste durch Aggregation und Präzipitation auftraten.

Aufgrund dieser Problematik war es nicht möglich, die Sensoroberflächen mit einer einheitlichen Oberflächenkonzentration zu belegen. Die gemessenen Assoziations- und Dissoziationskinetiken erlaubten jedoch eine vergleichende Betrachtung der Bindung von Cund R-Untereinheiten und eine Abschätzung der kinetischen Konstanten.

Als erste Beobachtung ist festzuhalten, dass alle untersuchten C-Untereinheiten mit allen verwendeten R-Untereinheiten assoziierten. Dies ist zwar als Charakteristikum einer katalytischen Untereinheit der PKA anzusehen, konnte in dieser Form aber bislang für C β 1 und C β 2 noch nicht gezeigt werden. Im Fall der regulatorischen Untereinheiten RI β und RII β konnte lediglich die Tatsache der Interaktion mit den untersuchten C-Untereinheiten

Ergebnisse

festgestellt werden, eine genaue Auswertung der kinetischen Daten war aufgrund des ungünstigen Signal-Rauschverhältnisses leider nicht möglich. Die für die Interaktion mit den RIa und RIIa-UE gemessenen Kinetiken ließen sich nicht mit den üblicherweise verwendeten Langmuir-Modell fitten, folgten jedoch auch nicht einem bivalenten oder Zweischritt-Konformationsänderungsmodell. Möglicherweise traten sekundäre Effekte auf, z.B. Dimerisierung des Analyten, welche die eigentliche Kinetik überlagerten. Durch separates Auswerten der schnellen Assoziationsphase und der Dissoziationsphase ließen sich jedoch bestimmen, die Geschwindigkeitskonstanten zur Berechnung des K_D–Wertes (Gleichgewichtsbindungskonstante) herangezogen werden konnten. Die Abbildungen 23 und 24 zeigen die Ergebnisse von SPR-Messungen der Bindung von RIa bzw. RIIa an die Ca, CB1 und CB2-Untereinheit im Vergleich. Auffällig ist die schnelle Assoziation der R-C Interaktion, gefolgt von einer sehr langsamen Dissoziationsphase, was Ausdruck einer sehr hohen Affinität ist. Diese Art der Interaktion ist typisch für die Interaktion von katalytischen und regulatorischen Untereinheiten. Die Bestimmung der Gleichgewichtsbindungskonstanten K_D ergab für die Bindung von RI α an C β 1 und C β 2 einen um den Faktor 2-4 geringeren Wert als für Ca (Tabelle 3), was für eine höhere Affinität der Cβ-Untereinheiten zu RIa spricht. Dabei wies CB1 eine um den Faktor 2-3 höhere Assoziationgeschwindigkeit mit RIa auf als Ca und CB2. Die Dissoziation der RIa-Untereinheit verlief dagegen bei CB1 und CB2 um einen Faktor zwei langsamer als bei Ca. Dieses Phänomen war bei unterschiedlichen Messungen konsistent und zeigt sich auch bei der Interaktion mit der RIIa-Untereinheit (Abbildung 29). Während sich hier die Assoziationsgeschwindigkeit bei den drei Isoformen kaum unterscheidet, verläuft die Dissoziation bei Ca etwa doppelt so schnell, was sich in einem doppelt so hohen K_D-Wert niederschlägt (Tabelle 4). Dies ist nach dem Befund von Gamm et al. (1996), dass CB1-haltige TypII-Holoenzyme bei niedrigeren cAMP-Konzentrationen aktiviert werden als C α enthaltende, der zweite Hinweis darauf, dass es sehr diskrete Unterschiede zwischen C α - und C β -Untereinheiten in der Interaktion mit den regulatorischen Untereinheiten gibt.

Ergebnisse



Abbildung 28: Oberflächenplasmonresonanz (SPR-) Messungen von RIa mit immobilisierten C-Untereinheiten.

Rekombinante C α - (A), C β 1 (B) oder C β 2-Untereinheiten (C) wurden mittels EDC-NHS Chemie an die Oberfläche eines CM5-Sensorchips gekoppelt. Die Interaktion wurde mit den angegebenen Konzentrationen von RI α bei einer Flussrate von 30 µl/min gemessen. Die Injektion des Analyten erfolgte zum Zeitpunkt t=0. Die Dissoziationsphase wurde durch Injektion von Laufpuffer ohne R-Untereinheiten gestartet. Nach jedem Lauf wurde die Sensoroberfläche mit 100µM cAMP/2 mM EDTA regeneriert. Für die Daten in Tabelle 3 wurden mit Hilfe der BIA-Evaluation 3.0-Software die Dissoziations- und Assoziationsphase getrennt ausgewertet und der K_D-Wert aus den erhaltenen k_d und k_a-Werten berechnet.



Abbildung 29: Oberflächenplasmonresonanz (SPR-) Messungen von RIIa mit immobilisierten C-Untereinheiten.

Rekombinante C α - (A), C β 1 (B) oder C β 2-Untereinheiten (C) wurden mittels EDC-NHS Chemie an die Oberfläche eines CM5-Sensorchips gekoppelt. Die Interaktion wurde in Anwesenheit von ATP mit den angegebenen Konzentrationen von RII α bei einer Flussrate von 30 µl/min gemessen. Die Messung und Auswertung wurde analog zur Messung mit RI α durchgeführt.

	k _a [M ⁻¹ s ⁻¹]	k _d [s ⁻¹]	K _D [nM]
Сα	$0,74 \ge 10^{6}$	4,9 x 10 ⁻⁴	0,7
Cβ1	1,8 x 10 ⁶	2,7 x 10 ⁻⁴	0,16
Св2	0.6 x 10 ⁶	1.95 x 10 ⁻⁴	0.3

Tabelle 3: Apparente Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_a und k_d sowie Gleichgewichtsbindungskonstante K_D für die Interaktion von C α , C β 1 und C β 2 mit der regulatorischen Untereinheit RI α der PKA, gemessen mit Oberflächenplasmonresonanz (Abbildung 28)

Tabelle 4: Apparente Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{ass} und k_{diss} sowie Gleichgewichtsbindungskonstante K_D für die Interaktion von C α , C β 1 und C β 2 mit der regulatorischen Untereinheit RII α der PKA, gemessen mit Oberflächenplasmonresonanz (Abbildung 29)

	$k_{a} [M^{-1}s^{-1}]$	$\mathbf{k}_{\mathbf{d}} [\mathbf{s}^{-1}]$	K _D [nM]
Са	$2,2 \ge 10^6$	8 x 10 ⁻⁴	0,36
Сβ1	2,2 x 10 ⁶	3,5 x 10 ⁻⁴	0,16
Cβ2	2×10^{6}	3,5 x 10 ⁻⁴	0,18

3.6.5 Interaktion zwischen GST-PKI und den C-Untereinheiten

Um die Bindung der Cβ-Untereinheiten das **PKI-Protein** mittels an Oberflächenplasmonresonanz zu untersuchen, wurde die von Zimmermann (1998) beschriebene Methode angewendet, bei der ein GST-PKI Fusionsprotein indirekt über anti GST Antikörper auf der Sensoroberfläche immobilisiert wird. Im Unterschied zu den Messungen mit den R-Untereinheiten befanden sich die C-Untereinheiten in diesem Fall als Analyten in der Flussphase. Um ein Präzipitieren während der Messung zu verhindern, mussten die Cβ-Untereinheiten dabei in Arginin-Elutionspuffer belassen werden. Messungen an einer Kontrolloberfläche zeigten jedoch keinen Einfluss des Puffers auf die Interaktion.

Abbildung 30 zeigt die Ergebnisse einer SPR-Messung von C β 1 und C β 2 mit GST-PKI. Es handelt sich um eine sehr starke und schnelle Interaktion. Auffallend ist, dass die Interaktion zu Beginn einem linearen Verlauf folgt, ein Hinweis darauf, dass diese Interaktion massentransportlimitiert ist. Dieses Phänomen tritt auf, wenn die Affinität des Analyten für den Liganden so hoch ist, dass die Analytmoleküle nicht schnell genug aus der Flussphase in die stationäre Phase an der Sensoroberfläche übertreten können. Somit ist die beobachtete Bindung nicht mehr von der Affinität der Interaktionspartner abhängig, sondern wird von der Rate begrenzt, mit welcher der Transfer der Analytmoleküle von der Flussphase auf die Sensoroberfläche erfolgt.

Die Bestimmung der Gleichgewichtsbindungskonstanten unter Berücksichtigung des Massentransfereffektes zeigte, dass die bovinen C β -Untereinheiten C β 1 und C β 2 mit einem apparenten K_D-Wert von 0,09 bzw. 0,23 nM (Tabelle 5) eine mindestens so hohe Affinität zu GST-PKI aufweisen wie C α , dessen K_D bei 0,5 nM liegt (Herberg, in Vorbereitung).



Abbildung 30: Oberflächenplasmonresonanz (SPR-) Messungen von Cβ1 und Cβ2 mit immobilisiertem GST-PKI Fusionsprotein.

GST-PKI-Fusionsprotein wurde für die Messungen auf einer anti-GST-Antikörperoberfläche immobilisiert. Die Interaktion mit C β 1 (A) bzw. C β 2 (B) wurde in Anwesenheit von MgATP mit den angegebenen Konzentrationen bei einer Flussrate von 30 μ l/min gemessen . Die Auswertung der Daten erfolgte analog zu den Messungen mit den R-Untereinheiten
	$k_a [M^{-1}s^{-1}]$	k _d [s ⁻¹]	K _D [nM]
Cβ1	$3,6 \ge 10^6$	3,1 x 10 ⁻⁴	0,09
Сβ2	1.9×10^{6}	4.5×10^{-4}	0.23

Tabelle 5: Apparente Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{ass} und k_{diss} sowie Gleichgewichtsbindungskonstante K_D für die Interaktion von C β 1 und C β 2 mit GST-PKI, gemessen mit Oberflächenplasmonresonanz.

3.7 Untersuchungen zur Substratspezifität der C-Untereinheiten

3.7.1 Phosphorylierung bekannter PKA-Substrate durch Cβ1 und Cβ2

Um zu überprüfen, ob es Unterschiede in der Substratspezifität zwischen C α und C β 1 bzw. CB2 gibt, wurden zunächst mehrere bekannte PKA-Substrate in einem radioaktiven Phosphorylierungsassay mit rekombinant exprimierten C-Untereinheiten eingesetzt. Als Substrate wurden dabei kommerziell erhältliche Histonpräparationen (HistonIIAS, Sigma; Core Histone, Roche), sowie Phosphorylase Kinase, basisches Myelin-Protein und ein Lysat GST-CREB exprimierender Bakterien verwendet. Wie Abbildung 31 zeigt, werden sowohl die Core Histone und GST-CREB von allen drei Isoformen phosphoryliert, während die Phosphorylasekinase eine deutliche Autophosphorylierung aufweist (Spur "K"); der Einbau von Radioaktivität wird durch die C-Untereinheiten nur minimal verstärkt. Möglicherweise liegt das Protein bereits in der durch die PKA phosphorylierten Form vor und kann daher nicht mehr zusätzlich markiert werden. Das basische Myelin-Protein zeigt dagegen bei der Phosphorylierung durch die C β -Isoformen ein geringeres Signal als im Falle von C α . Dies lässt bei Verwendung der HistonIIAS-Präparation als Substrat sogar in noch stärkerem Maße beobachten. Dieser Befund ist insofern interessant, als Histone bereits seit langem in radioaktiven Phosphorylierungsassays als Substrat für die Cα-Untereinheit eingesetzt werden. Bei der zweiten verwendeten Histonpräparation (Core-Histone, Roche) konnten dagegen keine Unterschiede in der Phosphorylierung durch die drei Isoformen der C-Untereinheit festgestellt wurden (Abbildung 31).

Diese Daten weisen erstmalig auf Unterschiede in der Substratspezifität zwischen C α und C β -Untereinheiten hin. Das basische Myelin-Protein und HistonIIAS (Sigma) werden von C β 1 und C β 2 in geringerem Maße phosphoryliert als von C α .



Abbildung 31: Phosphorylierung verschiedener PKA-Substrate durch Ca, CB1 und CB2

Die angegebenen Substrate wurden in Kinase-Assay Puffer zusammen mit der jeweiligen C-Untereinheit (5 nM) und γ -³²P ATP für 20 min (GST-CREB 5 min) bei 30°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt. Ansätze ohne C-Untereinheiten wurden als Kontrolle verwendet. Aliquots der Reaktionen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, und die coomassie-gefärbten und getrockneten Gele autoradiographisch analysiert.

K: Kontrolle (ohne Kinase), *Spur 1*: C α , *Spur 2*: C β 1, *Spur 3*: C β 2. Das verwendete Substrat ist über den jeweiligen Spuren angegeben.

3.7.2 HistonIIAS inhibiert die Phosphorylierung von ANP und MBP durch Cβ1 und Cβ2

Um zu untersuchen, ob es sich bei der unterschiedlichen Phosphorylierung von HistonIIAS durch die C α - und C β -Untereinheiten um eine unterschiedliche Substratspezifität oder einen inhibitorischen Effekt handelt, wurde der Einfluss von HistonIIAS auf die Phosphorylierung

anderer Substrate untersucht. Dazu wurde zunächst MBP zusammen mit steigenden Konzentrationen von HistonIIAS in einem radioaktiven Phosphorylierungsassay eingesetzt. Zwar wurde zuvor beobachtet, dass MBP für die C β -Untereinheiten ein schlechteres Substrat darstellt als für C α , was für eine etwaige Inhibition dieser Phosphorylierung jedoch nicht von Belang ist. Wie Abbildung 32 zeigt, nimmt im Falle der C β -Untereinheiten der Phosphorylierungsgrad tatsächlich mit steigender HistonIIAS-Konzentration im Reaktionsansatz ab, während er für C α unverändert bleibt.



Abbildung 32: Die Phosphorylierung von MBP wird bei C ß und C ß d und C ß und C s und C und C s und C und C und C s und C und C s und C und C

20 ng rekombinanter C-Untereinheit in 40 μ l Gesamtvolumen wurden zusammen mit 5 μ g MBP und den angegeben Mengen HistonIIAS in einem radioaktiven Phosphorylierungsassay eingesetzt und für 30 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben über SDS-PAGE getrennt. Die Abbildung zeigt eine Autoradiographie des SDS-Gels. Die verwendete C-Untereinheit ist neben der zugehörigen Abbildung angegeben, die Position des Myelin Basic Protein durch einen Pfeil gekennzeichnet. *K*: Kontrolle – Histon + MBP ohne Kinase *H*: Histon ohne MBP mit Kinase.

Die insgesamt geringere Phosphorylierung im Fall von Cβ2 ist auf eine schwächere Aktivität der verwendeten Präparation zurückzuführen.

Um diesen Effekt bestätigen zu können, wurde das gleiche Experiment mit einem weiteren Substrat durchgeführt, dem atrialen natriuretischen Peptid (ANP). Dieses 28 Aminosäurereste große, bioaktive Peptid wurde bereits als *in vitro* und *in vivo* Substrat für die cAMP-abhängige Proteinkinase beschrieben (Rittenhouse et al., 1986; Kübler et al, 1992). Nachdem in Vorexperimenten bestätigt wurde, dass ANP für alle drei Isoform ein vergleichbar gutes Substrat ist, wurde analog zum oben beschriebenen Experiment vorgegangen. Wie schon bei MBP zeigte sich auch hier eine Abnahme der Phosphorylierung von ANP durch C β 1 und C β 2 bei Zusatz steigender Mengen von HistonIIAS (Abbildung 33). Bei C α war dieser Effekt, der bei C β 1 noch etwas stärker ausgeprägt war als bei C β 2, nicht zu beobachten,. HistonIIAS bzw. ein Bestandteil der Präparation scheint also tatsächlich einen inhibitorischen Effekt auf die Phosphorylierungsaktivität der C β -Untereinheiten auszuüben.



Abbildung 33: Die Phosphorylierung des ANP wird bei C ß und C ß und C ß und C s und L s

20 ng C α und C β 1 bzw. 45 ng C β 2 (da nur etwa 50% so aktiv), wurden in einem radioaktiven Phosphorylierungsassay mit 600 ng ANP und unterschiedlichen Mengen HistonIIAS eingesetzt. Nach 15 min wurde die Reaktion mit LDS-Probenpuffer abgestoppt und die Hälfte jeder Probe in einem 4-12% NuPAGE Bis-Tris Gradientengel getrennt. Die Abbildung zeigt eine Autoradiographie des Gels. Die verwendete C-Untereinheit ist unter der zugehörigen Abbildung angegeben, die Menge des eingesetzten Histon IIAS in µg über der entsprechenden Spur. Die Position des ANP ist mit einem Pfeil markiert. Bei den oberen Banden handelt es sich um die Histone.

3.7.3 Die inhibitorische Aktivität von Histon IIAS auf die C β -Untereinheiten zeigt Charakteristika eines Proteins

Nach der Entdeckung der inhibitorischen Aktivität in der HistonIIAS-Präparation war zunächst die Natur des Inhibitors zu klären. Da es denkbar ist, dass ein niedermolekularer Bestandteil (z.B. Salze, Metallionen) für diesen Effekt verantwortlich ist, wurde ein Aliquot einer HistonIIAS-Lösung (1,6 mg/ml) einer Gelfiltration mit einer Sephadex G25 Säule (NAP-5, Amersham-Pharmacia, Ausschlussgrenze ca. 5000 Da) unterzogen, um die Proteine von niedermolekularen Substanzen zu trennen und den Puffer gegen PBS auszutauschen. Die proteinhaltigen Elutionsfraktionen (Fraktion 2-4) wurden daraufhin einem radioaktiven Phosphorylierungsassay unterzogen, bei dem die Core-Histon Präparation von Roche als Kontrolle und Referenz diente.

Wie Abbildung 34 zeigt, ergibt sich bei der Phosphorylierung von Histon IIAS durch C β 1 und C β 2 ein deutlich schwächeres Signal als bei C α , wie schon zuvor beobachtet (Abbildung 31). Auch nach der Gelfiltration wird Histon IIAS von den C β -Isoformen nur schwach phosphoryliert (Spur 2-4), bei C α jedoch weiterhin sehr stark. Die insgesamt geringere Signalstärke bei der C β 2-katalysierten Reaktion ist vermutlich auf die geringere Aktivität der Enzympräparation zurückzuführen.



Abbildung 34: Autoradiographie eines Phosphorylierungsassays mit gelfiltriertem HistonIIAS

20 ng der jeweiligen C-UE wurden in einem radioaktiven Phosphorylierungsassay mit je 5 μ g Histon in einem Gesamtvolumen von 40 μ l eingesetzt (**R**: Core Histone, Roche; **HIIAS**: Histon IIAS, Sigma; **2-4**: Fraktionen 2-4 aus Gelfiltration NAP5-Säule). Nach 30 min wurde die Reaktion mit SDS-Probenpuffer gestoppt und jeweils die Hälfte der Ansätze im SDS-Gel aufgetrennt. Die Abbildung zeigt eine Autoradiographie der getrockneten Gele.

Die inhibitorische Aktivität wurde nicht durch die Gelfiltration abgetrennt, sonst wäre eine Zunahme des Phosphorylierungsgrads im Fall von C β 1 und C β 2 zu erwarten gewesen. Damit ist es sehr wahrscheinlich, dass dieser Effekt auf einen höhermolekularen Bestandteil in der Histon IIAS-Präparation zurückzuführen ist.

Eine weitere Möglichkeit ist das Vorhandensein einer proteolytischen Aktivität in der Histonpräparation, zumal sich insbesondere C β 2 im Gegensatz zu C α bei der rekombinanten Expression in *E. coli* als sehr anfällig gegenüber Proteolyse gezeigt hat (3.4.1). Um dies zu überprüfen, wurden rekombinant exprimierte und gereinigte C-Untereinheiten für 30 Minuten bei 30°C mit HistonIIAS in Kinaseassay-Puffer inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen. Anschließend wurden die entnommenen Proben über SDS-PAGE mit darauffolgendem Immunoblot analysiert. Abbildung 35 zeigt, dass in diesem Zeitraum kein nachweisbarer Abbau der C-Untereinheiten auftrat, was eine Protease als Urheber des inhibitorischen Effektes ausschließt.



Abbildung 35: Die Inhibition der Phosphorylierung durch HistonIIAS ist nicht auf Proteolyse zurückzuführen

Je 20 ng gereinigter rekombinanter C-Untereinheiten wurden in einem Gesamtvolumen von 40 μ l für 30 min bei 30°C mit 5 μ g Histon IIAS inkubiert und zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen. Die Proben wurden in einem 12% SDS-Gel aufgetrennt und auf PVDF-Membran geblottet. Die Detektion der C-Untereinheiten erfolgte mit dem anti PKA_{βcat} Antikörper. Die schwache Färbung von C α ist darauf zurückzuführen, dass dieser Antikörper die C α -Untereinheit schlechter erkennt als C β .

H: HistonIIAS (Negativkontr.); K: C-Untereinheit (Positivkontr.) M: Molekulargewichtsstandard

Um die Natur des Inhibitors weiter charakterisieren zu können, wurde die HistonIIAS Präparation verschiedenen Behandlungen unterzogen und anschließend in einem Phosphorylierungsassay mit MBP als Indikator für eine Inhibition eingesetzt (Abbildung 36). So konnte nach einem Trypsinverdau von HistonIIAS keine Inhibition der MBP

Ergebnisse

Phosphorylierung bei den C β -Untereinheiten festgestellt werden (Spur 3), ein deutlicher Hinweis auf ein Polypeptid als Inhibitor. Ein gleich behandelter Ansatz ohne Trypsin zeigte dagegen die Inhibition (Spur 4). Das noch im Reaktionsansatz verbliebene Trypsin hatte dabei keinen Einfluss auf die Phosphorylierungsreaktion, wie die MBP-Phosphorylierung mit Trypsin und dem Trypsininhibitor aus Sojabohnen (STI) im Reaktionsgemisch zeigt (Spur 5). Auch das Erhitzen von HistonIIAS auf 95°C konnte die Inhibition der MBP-Phosphorylierung durch die C β -Untereinheiten ganz (C β 2) oder teilweise (C β 1) aufheben (Spur 6). Möglicherweise ist letzteres auf die bevorzugte Phosphorylierung von Histon zurückzuführen, die nach der Hitzebehandlung in allen Fällen stärker ist als in der Kontrolle (Spur 2). Dies ist vermutlich dadurch bedingt, dass durch die hitzebedingte Denaturierung zusätzliche Phosphorylierungsstellen zugänglich werden. Die hier beschriebenen Befunde deuten ebenfalls auf ein Protein als den möglichen Inhibitor der Phosphorylierungsaktivität von C β 1 und C β 2 hin.



Abbildung 36: Der Inhibitor in der HistonIIAS Präparation ist trypsin- und hitzesensitiv

600 μg HistonIIAS wurden entweder für 12 h bei 37°C mit 50 μg Trypsin verdaut und die Reaktion mit 100 μg Sojabohnen Trypsininhibitor (STI) gestoppt oder für 15 min einer Hitzebehandlung (95°C) unterzogen. Aliquots dieser Proben wurden anschließend mit den drei katalytischen Untereinheiten in einem radioaktiven Phosphorylierungsassay mit MBP als Substrat eingesetzt. Die Abbildung zeigt die Autoradiographie eines SDS-Gels. *Spur 1*: nur MBP; *Spur 2*: MBP + HistonIIAS, unbehandelt; *Spur 3*: MBP + HistonIIAS, trypsinbehandelt; *Spur 4*: wie Spur 3, jedoch ohne Trypsin im Ansatz.; *Spur 5*: MBP+Trypsin+STI; *Spur 6*: MBP+HistonIIAS; hitzebehandelt.

Die Position des Myelin Basic Proteins ist jeweils durch einen Pfeil gekennzeichnet.

3.7.4 Histon H3 ist für die C β -Untereinheiten ein schlechteres Substrat als für C α

Da die inhibitorische Aktivität in der HistonIIAS Präparation offensichtlich auf ein Protein zurückzuführen ist, waren die bekannten im HistonIIAS enthaltenen Proteinspezies, nämlich die Histone H1, H2A, H2B, H3 und H4 Gegenstand weiterer Untersuchungen. Zu diesem Zweck wurden rekombinant hergestelltes Histon H1, sowie kommerziell erhältliche Präparationen der übrigen Histone in radioaktiven Phosphorylierungsassays mit C α , C β 1 und C β 2 untersucht (Abbildung 37).



Abbildung 37: Phosphorylierung der Histone H2A, H2B, H3 und H4 durch Ca, CB1 und CB2

Rekombinant hergestelltes Histon H1, sowie kommerziell erhältliche Präparationen der angegebenen Histonspezies (je 2 µg) wurden in einem Phosphorylierungsassay mit C α , C β 1 und C β 2 (je 20 ng) eingesetzt. Die Reaktion wurde nach 30 min mit SDS-Probenpuffer gestoppt und Aliquots der einzelnen Reaktionen über SDS-PAGE analysiert. Die Abbildung zeigt die Autoradiographien der SDS Gele. K: Negativkontrolle, Spur 1: C α , Spur 2: C β 1, Spur 3, C β 2. Die verwendete Histonspezies ist unter den zugehörigen Spuren angegeben. Dabei ergaben sich für Histon H2A, H2B und Histon H4 keine signifikanten Unterschiede in der Phosphorylierung durch die verschiedenen C-Untereinheiten. Histon H1 zeigte generell eine nur schwache Phosphorylierung, die bei C β 2 geringer zu sein schien als bei C α , bei C β 1 jedoch stärker. Histon H3 jedoch wurde von C β 1 und C β 2 deutlich schwächer phosphoryliert, als von der C α -Untereinheit. Dies stellt eine bemerkenswerte Parallele zu dem bei HistonIIAS beobachteten Effekt dar. Daher war zu klären, ob es sich dabei um denselben inhibitorischen Effekt wie zuvor oder aber um eine unterschiedliche Substratspezifität der C β -Untereinheiten handelt.

3.7.5 Histon H3 inhibiert nicht die Phosphorylierung des ANP durch die C β -Untereinheiten

Da Histon H3 in der Phosphorylierung durch die C β -Untereinheiten einen vergleichbaren Effekt zeigte wie die HistonIIAS-Präparation, wurde im folgenden untersucht, ob die zuvor beobachtete Inhibition der Phosphorylierung des ANP durch HistonIIAS (3.7.2) möglicherweise von dem in HistonIIAS enthaltenen Histon H3 verursacht wurde. Zu diesem Zweck wurde in Phosphorylierungsassays die ANP-Phosphorylierung durch die C-Untereinheiten in Abwesenheit von Histon verglichen mit der Phosphorylierung in Gegenwart von entweder 10 µg HistonIIAS oder 10 µg Histon H3 (Abbildung 38). Wie bereits zuvor zeigte sich, dass sowohl HistonIIAS als auch Histon H3 von den C β -Untereinheiten deutlich schlechter phosphoryliert werden als von C α . Während jedoch im Falle von HistonIIAS die bekannte Inhibition der C β -vermittelten ANP-Phosphorylierung auftrat (Abbildung 38A, Mitte) war dies bei Histon H3 nicht der Fall. Das Phosphorylierungssignal ging zwar bei C β 2 im Vergleich zur Kontrolle leicht zurück (Abbildung 38A, rechts, Spur 3), die ANP-Phosphorylierung durch C β 1 blieb jedoch unbeeinflusst (Abbildung 38A, rechts, Spur 2).

Ganz offensichtlich handelt es sich also bei der schwachen Histon H3-Phosphorylierung durch die C β -Untereinheiten und der Inhibition der ANP-Phosphorylierung um zwei getrennte Phänomene. Folglich muss ein weiterer, bislang nicht identifizierter Bestandteil der HistonIIAS-Präparation für den inhibitorischen Effekt auf die C β -Untereinheiten verantwortlich sein.



Abbildung 38: HistonIIAS, aber nicht Histon H3 inhibiert die ANP-Phosphorylierung durch die Cβ-Untereinheiten

20 ng C-Untereinheit wurden in einem radioaktiven Phosphorylierungsassay mit $0,6 \mu g$ ANP ohne oder mit 10 μg Histon IIAS bzw. Histon H3 eingesetzt. Die Reaktion wurde nach 10 min durch Zugabe von LDS-Probenpuffer gestoppt und die Hälfte jeder Probe in einem 4-12% NuPAGE Bis-Tris Gradientengel getrennt.

A Autoradiographie der SDS-Gele: *Spur 1:* C α , *Spur 2*: C β 1, *Spur 3*: C β 2. Die Position des ANP ist durch eine Pfeilspitze markiert. Bei den höhermolekularen Banden handelt es sich um die Histone.

B Densitometrische Auswertung mit der Software *TINA 2.09*. Das Phosphorylierungssignal in Abwesenheit von Histon wurde als 100% angenommen.

Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht mehr möglich, diesen Inhibitor weiter zu charakterisieren. Versuche, die HistonIIAS-Präparation über säulenchromatographische Verfahren zu fraktionieren, wurden durch die starke Basizität der Proteine erschwert. Um HistonIIAS in ausreichender Konzentration für die Chromatographie in Lösung zu bringen, musste 8M Harnstoff als Lösungsmittel verwendet werden, des weiteren erfolgte die Elution in stark saurem Milieu mit 20 mM HCl, 50 mM NaCl. Die inhibitorische Aktivität in der HistonIIAS-Präparation ging bereits durch diese Probenbehandlung verloren. Auch dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass es sich bei dem Inhibitor um ein Protein handelt, welches im denaturierten Zustand seine inhibitorische Aktivität verliert.

Diskussion

4 Diskussion

Die cAMP-abhängige Proteinkinase oder Proteinkinase A (PKA) spielt eine zentrale Rolle bei der Signaltransduktion in eukarvotischen Zellen von der Hefe bis zu den Säugetieren. Sie phosphoryliert verschiedenste Substratproteine im Cytoplasma und im Zellkern und reguliert dadurch Fülle zellulärer Vorgänge, darunter so grundlegende wie eine den Energiestoffwechsel, Zellwachstum und Zelldifferenzierung. Die Phosphorylierungsreaktion wird von den katalytischen Untereinheiten (C-Untereinheiten) durchgeführt, die im inaktiven PKA-Holoenzym an die regulatorischen Untereinheiten (R-Untereinheiten) gebunden vorliegen und bei Erhöhung des cAMP-Spiegels freigesetzt werden. Über einen langen Zeitraum war nur eine C-Untereinheit bekannt, die Hauptisoform C α . Diese gilt heute als bestuntersuchte Proteinkinase überhaupt und dient als Modell für die gesamte Proteinkinasefamilie. Die Entdeckung weiterer Isoformen der katalytischen Untereinheit, Cß und Cy (Showers and Maurer, 1986; Beebe et al., 1990), warf die Frage nach spezifischen Funktionen der Isoformen auf. Ein noch komplexeres Bild ergab sich durch die Entdeckung einer Spleißvariante der CB-Untereinheit, die als CB2 bezeichnet wurde (Wiemann et al. 1991). Diese Isoform zeichnet sich durch einen ungewöhnlichen N-Terminus von 62 Aminosäureresten aus, der keinerlei Homologie zu anderen bekannten Proteinen zeigt. Bislang entzog sich dieses Protein allen Versuchen zur rekombinanten Expression, konnte aber aus Rinderherzgewebe partiell gereinigt und als typische katalytische Untereinheit der PKA charakterisiert werden (Thullner, 1997). Bislang sind sowohl über Cβ1 als auch über CB2 nur wenige Untersuchungen durchgeführt worden, die Aufschluss über Unterschiede zur Hauptisoform Ca geben könnten. In der vorliegenden Arbeit wurden Studien zur rekombinanten Proteine einer vergleichenden Charakterisierung mit der Ca-Untereinheit unterzogen.

4.1 Isoformspezifische Antikörper gegen die C-Untereinheiten als wichtiges Werkzeug für immunbiochemische Untersuchungen

Bislang durchgeführte Untersuchungen zum Vorkommen verschiedener katalytischer Untereinheiten der PKA in Gewebe- und Zellkulturzellen wurden durch die Tatsache erschwert, dass es aufgrund der starken Homologie der C-Untereinheiten zu Kreuzreaktionen der verwendeten Antikörper kommt. So ist beispielsweise davon auszugehen, dass Antikörper, die vor der Entdeckung weiterer Isoformen gegen die damals einzige bekannte C-Untereinheit aus Rinderherzgewebe gewonnen wurden (Murtaugh et al. 1982), tatsächlich eine Mischung von Antikörpern gegen alle in der Antigenpräparation enthaltenen C-Untereinheiten darstellen. So enthält Rinderherzgewebe, wie auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, eine Mischung aus C α -, C β 1- und C β 2-Untereinheiten. Die Kreuzreaktivität erstreckt sich dabei nicht nur auf die Isoformen einer Spezies, sondern ist aufgrund der hohen Konserviertheit der C-Untereinheiten in der Evolution häufig auch speziesübergreifend. Antikörper, die gegen die C α -Untereinheit aus Mäusen gerichtet sind, erkennen beispielsweise Ca und CB-Isoformen aus Ratten-, Hamster und Humangewebe, sowie in geringerem Maße auch bovine Isoformen (Lee et al., 1996). Auch die in einem Teil dieser Arbeit verwendeten kommerziell erhältlichen Antiköper, die gegen humane C-Untereinheiten gerichtet sind, konnten sehr effizient zum Nachweis der bovinen Ca und CB-Isoformen verwendet werden. Diese Peptidantikörper gegen humane C-Untereinheiten (anti PKA α_{cat} , anti PKABcat, Santa Cruz Biotech., Heidelberg) sind gegen die 20 Aminosäurereste am C-Terminus des Proteins gerichtet. Dort gibt es zwar an vier Positionen Unterschiede zwischen den einzelnen Isoformen, jedoch ist die Sequenz des antigenen Peptides bei diesen Antikörpern vermutlich zu lang, um eine Isoformspezifität zu gewährleisten.

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Peptidantikörper Anti-C α (35-46) und Anti-C β (35-46) erlauben es dagegen, zwischen bovinen C α - und C β -Isoformen zu unterscheiden, ohne dass es zu Kreuzreaktionen kommt. Dies ist insbesondere im Hinblick auf die Unterscheidung zwischen C α und C β 1 von Bedeutung, da diese ein fast identisches Molekulargewicht besitzen und nicht nur bei der SDS-Gelelektrophorese ein identisches Laufverhalten zeigen, sondern auch bei identischer Induktivität im Salzgradienten einer Mono-S-Chromatographie eluieren (Thullner, 1997). Von entscheidender Bedeutung für die erfolgreiche Gewinnung dieser Antikörper dürfte die Wahl der antigenen Peptide aus dem N-terminalen Bereich des jeweiligen Proteins gewesen sein, nämlich der Aminosäurereste 35-46. Hier unterscheiden

sich C α und C β in sechs der elf Reste, welche einen Bereich an der Proteinoberfläche bilden, der Helix A mit dem ersten konservierten β -Faltblattstrang der katalytischen Region verbindet (vgl. Abbildung 2, Bossemeyer et al., 1993).

Der mit Hilfe der isoformspezifischen Antikörper erhobene Befund, dass C
ß1 einen nicht unerheblichen Anteil der C-Untereinheiten aus Rinderherz ausmacht, bestätigt massenspektrometrische Untersuchungen, die einen C β 1-Anteil von 30% in diesem Gewebe nachwiesen (Jedrzejewski et al., 1998) und wirft erneut die Frage nach einer gewebsspezifischen Aufgabe dieser Isoform auf. Während die Ca-Untereinheit ubiquitär exprimiert wird (Shoji et al., 1981, Wiemann et al, 1991 und 1992), sind sowohl CB1 als auch CB2 am stärksten in Hirn- und Herzgewebe vertreten, sowie in geringerem Maße in Milz- und Skelettmuskelgewebe (Uhler et al., 1996, Wiemann et al, 1991, Shuntoh et al., 1992) Bislang konnte ein spezifischer Einfluss von C
ß1 nur im Hirngewebe von M
äusen nachgewiesen der Gedächtnisbildung auf, da die Langzeitpotenzierung von Aktionspotentialen - ein transkriptionsabhängiger Prozess - deutlich vermindert war (Huang et al., 1995; Qi et al., 1996).

Untersuchungen mit den isoformspezifischen Antikörpern Anti-C α (35-46) und Anti-C β (35-46) an der cAMP-insensitiven Hamsterzelllinie CHO₁₀₂₆₀ bestätigten, dass - wie zuvor beschrieben (Murtaugh et al., 1982, Howard et al., 1991) - die immunreaktive Menge an C-Untereinheiten im Vergleich zu Wildtyp CHO-Zellen insgesamt deutlich vermindert war. Die vorliegende Arbeit zeigt darüber hinaus, dass dieser Mangel an funktionellen C-Untereinheiten jedoch offenbar auf die C α -Untereinheit beschränkt ist, die C β -Untereinheiten sind davon nicht betroffen. Dieser Befund stimmt mit der Beobachtung überein, dass diese Zellen ein Defizit an intakter C α -mRNA aufweisen, die Menge an C β 1-mRNA jedoch unverändert ist (Howard et al., 1991). Offensichtlich wird, trotz des Vorhandenseins der CB1-Untereinheit in den CHO₁₀₂₆₀ Zellen keine cAMP-Antwort ausgelöst. Bereits von Howard et al. wurden dafür verschiedene Gründe diskutiert: eine weniger effiziente Translation der CB1mRNA, eine geringere Stabilität des Proteins oder eine schlechtere Assoziation mit regulatorischen Untereinheiten (und daher keine Erhöhung der Kinaseaktivität nach cAMP-Gabe). Die Oberflächenplasmonresonanzmessungen in dieser Arbeit (3.6.4) deuten jedoch darauf hin, dass die Cβ-Untereinheiten eine höhere Affinität zu den R-Untereinheiten haben, als die C α -Untereinheit, daher ist die letztere Annahme eher unwahrscheinlich. Die Tatsache, dass - verglichen mit Wildtypzellen - die Intensität der Immunfärbung von Ca und CB1

gemeinsam stark abnimmt, die von C β 1 für sich alleine genommen jedoch nicht (Abbildung 7), deutet auf eine geringe Menge von C β 1-Protein in CHO-Zellen generell hin. Ein Hinweis, dass eventuell die Quantität des C β 1-Proteins in der Zelle die cAMP-Antwort limitiert, kommt aus einer früheren Untersuchung: eine Überexpression des C β 2-Proteins in den CHO₁₀₂₆₀-Zellen kann den cAMP-responsiven Phänotyp zu einem großen Teil, wenn auch nicht vollständig, wiederherstellen (Thullner, 1997). Dies könnte also darauf zurückzuführen sein, dass das heterologe C β 2-Gen zwar stärker exprimiert wird als das endogene C β 1-Gen, jedoch nicht stark genug, um den normalen Phänotyp wiederherzustellen. Es wäre jedoch auch denkbar, dass gewisse Funktionen der C α -Untereinheit nicht von den C β -Untereinheiten übernommen werden können, dass also eine Isoformspezifität vorliegt. Das letztere deuten zumindest gewisse morphologische Veränderungen an, die nur bei C β 2-überexprimierenden CHO₁₀₂₆₀ Zellen auftreten, nicht aber beim C α tragenden Wildtyp (Thullner, 1997, Thullner et al., 2000).

Im Gegensatz zur C β 1-Untereinheit, die mit dem C β (35-46)-Antikörper detektiert wurde, konnte das C α -Protein in CHO-Zellen nicht mit dem isoformspezifischen C α (35-46)-Antikörper nachgewiesen werden. Bedingt ist dies vermutlich durch eine geringfügige Sequenzabweichung zwischen boviner und muriner Sequenz. Die Positionen der Aminosäurereste 39 und 42, ein Histidin- und ein Glutaminrest, die in der Kristallstruktur des bovinen Proteins eine Wasserstoffbrückenbindung eingehen können (s. Abbildung 8) sind in der murinen Sequenz vertauscht. Es ist daher anzunehmen, dass diese Aminosäurereste eine entscheidende Rolle bei der Erkennung durch die spezifischen Antikörper spielen. So sind in der für den C β (35–46)-Antikörper verwendeten Sequenz im Vergleich zu C α unter anderem Histidin 39 durch Glycin und Glutamin 42 durch Glutamat ersetzt.

Dies zeigt, dass bei der Antigen-Antikörper-Bindung im Falle dieses kurzen Peptids die räumliche Anordnung der Aminosäurereste von großer Bedeutung ist. Da es sich um einen polyklonalen Antikörper handelt, aber dennoch durch das Vertauschen der Position zweier Aminosäurereste im Antigen dessen Erkennung verhindert wird, ist es sinnvoll, anzunehmen, dass eben diese beiden Aminosäurereste zentrale Bedeutung bei der Epitopbildung haben.

Ein weiterer Faktor ist in diesem Zusammenhang die Länge des zur Antikörperherstellung verwendeten antigenen Peptids. Die kommerziellen Antikörper, die in dieser Studie verwendet wurden, basieren auf einer fast doppelt so langen Peptidsequenz, auf der die Unterschiede zwischen den C-Isoformen eine stärkere Streuung aufweisen, während in den elf Reste umfassenden C α - bzw. C β (35-46)-Peptiden, die divergierenden Aminosäurereste auf

einen kleineren Bereich konzentriert sind, wodurch offensichtlich die höhere Spezifität erreicht werden konnte.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Antikörper Anti-C α (35-46) und Anti-C β (35-46) ein wichtiges Werkzeug für weitere immunbiochemische Untersuchungen der C α und C β -Untereinheiten darstellen. Im Western-Blot erlauben sie eine effektive Unterscheidung zwischen C α - und C β -Untereinheiten, was bislang mit kommerziell erhältlichen Antikörpern – wenn überhaupt - nur sehr begrenzt möglich war. Die Effektivität bei anderen Untersuchungen, wie z.B. der Immunpräzipitation und der Immunfluoreszenz ist jedoch noch zu etablieren. Dies wird davon abhängig sein, ob das Epitop auch im nativen Zustand des Proteins erkannt wird und nicht beispielsweise durch Interaktionspartner der katalytischen Untereinheit maskiert wird.

4.2 Rekombinante Expression der Cβ-Untereinheiten

4.2.1 Expression von Cβ1 in *E. coli*

Zur Charakterisierung der Cβ-Untereinheiten mussten diese in möglichst reiner Form gewonnen werden. Wie bereits beschrieben, waren bisherige Versuche, die native CB2-Untereinheit aus Geweben durch konventionelle Proteinreinigungsmethoden von den Hauptisoformen Ca und CB1 zu trennen, nicht erfolgreich, ebenso wenig der Versuch der rekombinanten Expression in E. coli (Thullner, 1997), obwohl für Ca die bakterielle Expression bereits seit einiger Zeit etabliert ist (Slice and Taylor, 1989). Die CB1-Untereinheit konnte jedoch in dieser Arbeit in großen Mengen und in reiner Form durch Expression in *E. coli* BL21(DE3) gewonnen werden. Eine Expression des C_β1-Gens in *E. coli*-Zellen ist bislang nur mit relativ geringer Ausbeute beschrieben worden (Gamm et al. 1996). Gamm et al. verwendeten dazu jedoch einen Expressionsvektor mit geringerer Expressionsrate und den E. coli Stamm BL21(DE3) pLysS, der die basale, nichtinduzierte Expression des heterologen Gens über den T7-Promoter stark reduziert. Sowohl eine verringerte Expressionsrate, als auch die verminderte basale Expression können dazu dienen, die Löslichkeit eines Proteins zu erhöhen (Schein and Noteborn, 1988). Tatsächlich wurde bereits zuvor beschrieben, dass die Expression des CB-Gens aus CHO-Zellen in E. coli BL21(DE3) Acya in fast ausschließlich unlöslichem Protein resultiert (Gosse et al, 1994). Dennoch erwies sich die in dieser Arbeit gewählte Kombination des pET28-CB1 Plasmids mit dem unmodifizierten BL21(DE3)-Stamm als geeignet, das CB1 Protein in löslicher und aktiver Form zu exprimieren und anschließend zur Homogenität zu reinigen. Als essentiell erwies sich auch hier das Absenken der Expressionstemperatur auf 24°C, um die Löslichkeit des Proteins zu erhöhen. Dies wurde bereits bei der rekombinanten Expression des C α -Gens in *E. coli* beschrieben (Slice und Taylor, 1989). Die Tatsache, dass dennoch ein beträchtlicher Anteil des C β 1-Proteins in der unlöslichen Fraktion des bakteriellen Lysates enthalten war (bis zu 50%), spielte aufgrund der hohen Expressionsrate für die vorliegenden Untersuchungen nur eine untergeordnete Rolle.

Es ist auffallend, dass bei allen bisher beschriebenen Fällen der Expression von C β 1 eine geringe Ausbeute und/oder schlechte Löslichkeit des rekombinant hergestellten Proteins festgestellt wurde. Auch in der vorliegenden Studie zeigte sich eine geringere Löslichkeit und eine schlechtere Ausbeute als bei der Expression der C α -Untereinheit. Dies ist aufgrund der hohen Homologie der beiden Proteine bemerkenswert. Ein Grund für die geringere Expressionsrate könnte die Verwendung seltener bakterieller Codone im C β 1-Gen sein, da insbesondere das in *E. coli* seltene Arginin-Codon AGA, sowie das Leucin-Codon CUA im C β 1-Gen häufiger auftauchen als im C α -Gen (Tabelle 5, zu seltenen Codonen vgl. Zhang et al., 1991).

Tabelle 5: Häufigkeit seltener *E. coli* Codone (nach Zhang et al., 1991) im Cα und Cβ1-Gen.

Aminosäuren (AS) sind im Drei-Buchstaben Code angegeben, in der darauffolgenden Spalte das entsprechende Codon und anschließend die Zahl der entsprechenden Codone im C α bzw. C β 1-Gen. Auffällige Häufungen gegenüber der jeweils anderen Isoform sind durch Fettdruck hervorgehoben.

AS	Codon	Cα	Cβ1
Leu	CUA	1	7
Ile	AUA	1	6
Ser	UCG	1	0
Pro	CCC	6	2
Arg	CGA	3	2
	CGG	4	2
	AGA	0	9
	AGG	2	3

Die unterschiedliche Löslichkeit der beiden Proteine – sowohl in *E. coli*, als auch in verschiedenen Puffern - könnte auf Unterschiede in der Tertiärstruktur des Proteins zurückzuführen sein, was wiederum ein Hinweis auf unterschiedliche Interaktionen der beiden Proteine in der eukaryotischen Zelle sein könnte. Mögliche Einflüsse der Sequenzunterschiede zwischen C α und C β -Untereinheiten werden später noch erörtert (4.5), bei einem Vergleich der Ladungsunterschiede zwischen C α und C β an der Proteinoberfläche (vgl. Abbildung 39) zeigen sich jedoch keine wesentlichen Differenzen zwischen den beiden Isoformen, welche die unterschiedlichen Löslichkeiten verursachen könnten. Da allerdings bislang keine Kristallstrukturdaten von einer C β -Untereinheit vorliegen, kann trotz der hohen Sequenzidentität keine endgültige Aussage über die tatsächliche Konformation des Proteins getroffen werden.



Cβ



Abbildung 39: Darstellung der Ladungsunterschiede zwischen Ca und Cß

Die Darstellungen wurden mit der Software Insight II erstellt. Für die Darstellung von C β wurden die gegenüber C α veränderten Aminosäuren in der C α -Sequenz entsprechend ersetzt. Die Abbildung zeigt die Aufsicht auf den oberen (kleinen) Lobus, der katalytische Spalt ist nach unten gerichtet. Die Seitenketten sind entsprechend ihrer Ladung farbcodiert: positiv – rot, negativ – blau, polar – türkis, hydrophob - gelb

Zu beachten ist jedoch der mögliche Einfluss von Cys348 in der C β 1-Sequenz, an dessen Position sich in der C α -Sequenz ein Serin befindet. C β 1 enthält damit drei Cysteinreste gegenüber zweien bei C α , womit es potentiell zu Fehlfaltungen durch die Ausbildung falscher Disulfidbrücken kommen könnte.

Ein möglicher Faktor ist jedoch auch die unterschiedliche posttranslationale Modifikation von eukaryotischen Proteinen in prokaryotischen Expressionssystemen. So weist in E. coli exprimiertes C α -Protein bis zu vier Phosphorylierungsstellen auf (Herberg et al., 1993; Jedrzejewski et al., 1998), eine weitere fünfte wurde bei aktuellen massenspektrometrischen Untersuchungen nachgewiesen (A. Schlosser, pers. Mitteilung). Beim nativen Protein konnte man dagegen bislang nur zwei Phosphorylierungsstellen nachweisen, an Thr197 und Ser338 (Shoji et al., 1983, Herberg et al, 1993). Bei der Phosphorylierung in E. coli handelt es sich wahrscheinlich um eine intermolekulare Autophosphorylierung (Girod et al., 1996), wobei die Phosphorylierung an Thr197 notwendig ist, um aktives C α -Protein zu erhalten (Steinberg et al, 1993; Girod et al, 1996). Die zusätzlichen, bei der Expression in E. coli auftretenden Phosphorylierungsstellen liegen, wie zu erwarten, alle in einer PKA-Konsensussequenz. Welche Mechanismen eine vergleichbare Autophosphorylierung in der eukaryotischen Zelle verhindern, ist unklar. Ein Grund könnte sein, dass die katalytische Untereinheit nur vorübergehend aktiviert wird und im Grundzustand durch R-Untereinheiten oder das PKI-Protein inhibiert wird. Während der stundenlangen Expression in E. coli liegen die C-Untereinheiten dagegen in hoher Konzentration und konstitutiv aktiv vor. Tatsächlich lässt sich der Anteil höher phosphorylierter Ca-Isoformen durch die Wahl kürzerer Expressionszeiten zugunsten geringer phosphorylierter Isoformen verringern (A.L.-Picciolo-Mitteilung). Andererseits aber die Lehrke, pers. könnte auch Aktivität von Proteinphosphatasen für den fehlenden Nachweis zusätzlicher Phosphorylierungsstellen in höheren Zellen verantwortlich sein.

Eine Ausnahme bildet dabei der Serinrest an Position 10, bei dem auch mit nativem Enzym eine – wenn auch langsame – Autophosphorylierung *in vitro* festgestellt werden konnte (Toner-Webb et al., 1992). Bislang konnte jedoch kein Einfluss auf die katalytische Aktivität des Proteins oder die Interaktion mit Substratproteinen *in vitro* nachgewiesen werden (Toner-Webb et al, 1992, Yonemoto et al., 1997). Bei der rekombinanten Expression von C β 1 wurde in dieser Arbeit darüber hinaus eine zusätzliche Autophosphorylierungsstelle an Ser321 entdeckt. Diese Stelle liegt ebenfalls innerhalb einer PKA-Konsensussequenz (K/R-X(X)-S), wobei im Falle von C α der Serin- durch einen Prolinrest ersetzt ist, so dass dort im Gegensatz zu C β 1 keine Phosphorylierung stattfinden kann. Da bislang jedoch keine der in *E. coli* zusätzlich auftretenden Phosphorylierungsstellen *in vivo* nachgewiesen werden konnte, ist es fraglich, ob diese physiologisch signifikant sind. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die fraglichen Aminosäurereste *in vivo* zumindest transient phosphoryliert werden können und so möglicherweise regulatorische Funktionen ausüben. Mutationsstudien zeigten, dass ein Austausch von Ser139 gegen Alanin keinen Einfluss auf die kinetischen Parameter und die Stabilität des Enzyms haben, während ein ebensolcher Austausch von Ser10 in unlöslichem und inaktivem Protein resultierte (Yonemoto et al., 1997). Somit scheint dieser Rest zumindest für die Expression von löslichem Phosphoprotein in *E. coli* von Bedeutung zu sein. An dieser Stelle sollte auch darauf hingewiesen werden, dass durch die PKI(5-24)-Affinitätschromatographie bereits eine Selektion auf lösliches, aktives Protein stattfindet, inaktives Protein bindet nicht an das PKI-Peptid. Somit ist es theoretisch möglich, dass weitere Phosphorylierungen für inaktives und unlösliches Protein verantwortlich sind, welches durch die Selektivität der Reinigungsmethode jedoch nicht erfasst wird.

Ein weiterer Unterschied zwischen nativer und rekombinant hergestellter C-Untereinheit liegt in der N-terminalen Myristylierung, die sowohl bei nativem C α als auch C β 1-Protein zu beobachten ist (Jedrzejewski et al., 1998). Die Bedeutung der Myristylierung ist ebenfalls unklar. noch weitgehend Die häufig mit einer Myristylierung verbundene Membranassoziation von Proteinen konnte für die C-Untereinheiten bislang nicht nachgewiesen werden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass Holoenzymkomplexe aus Nmyristylierten C- und RII-Untereinheiten verstärkt an Liposomen binden. (Gangal et al. 1999). Die Myristylierung beeinflusst zwar die Thermostabilität des Enzyms (Yonemoto et al., 1993), nicht aber die biologische Aktivität (Clegg et al., 1989). Auswirkungen einer fehlenden Myristylierung im rekombinanten Enzym auf die hier durchgeführten in vitro Untersuchungen sind daher nicht zu erwarten.

4.2.2 Expression von Cβ2 in *E. coli*

Während also sowohl die C α als auch die C β 1-Untereinheit durch rekombinante Expression in *E. coli* gewonnen werden können, erwies sich dies für die C β 2-Untereinheit als nicht durchführbar. Bereits vorhergehende Expressionsstudien mit dem T7 RNA Polymerasebasierten pET-Expressionssystem zeigten eine massive Degradation des Proteins als Hauptproblem auf (Thullner, 1997). Das Hauptabbauprodukt begann dabei mit Met62 des vollständigen C β 2-Proteins, war jedoch katalytisch aktiv. Die Verwendung eines alternativen Startcodons konnte damals durch Mutagenese des entsprechenden Codons ausgeschlossen werden. Somit muss eine bakterielle Protease für den Proteinabbau verantwortlich sein. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studien zeigen, dass die Proteindegradation bereits während der Expression geschieht (Abbildung 9), daher wurden verschiedene Strategien zur Minimierung des Abbaus angewendet. Die Optimierung der Fermentationsbedingungen wie Wachstumstemperatur, Induktionszeitraum und Stärke der Induktion zeigten dabei keinen Erfolg. Auch der Versuch, eine mögliche Erkennungssequenz der unbekannten Protease durch Mutagenese der vor der Spaltstelle liegenden Aminosäuren zu zerstören, war nicht erfolgreich. Dies könnte darin begründet liegen, dass die fragliche Protease Tertiärstrukturelemente statt einzelner Aminosäurereste erkennt. Dies wäre ein Hinweis darauf, dass die 62 N-terminalen Aminosäurereste des CB2-Proteins eine ausgeprägte Domänenstruktur aufweisen. Ein Wechsel des zur Expression verwendeten Bakterienstammes wurde dadurch erschwert, dass für T7-basierte Expressionssysteme nur eine begrenzte Zahl von Stämmen zur Verfügung steht. Zudem ist der BL21(DE3)-Stamm bereits defizient in den lon und OmpT-Proteasen, die häufig für den Proteinabbau in bakteriellen Systemen verantwortlich sind (Gottesman, S., 1989).

Mit dem wirtsstammunabhängigen *Strep-tag II* Expressionssystem wurden weitere Strategien zur Gewinnung intakten C β 2-Proteins untersucht. Neben dem Wechsel des Wirtsstammes konnte so der Einfluss eines Fusionspartners auf die Proteinstabilität untersucht werden. Tatsächlich wirkte sich die Fusion mit dem bakteriellen *OmpA*-Signalpeptid positiv auf die Stabilität des gesamten Proteins aus. Dies ist offensichtlich nicht auf einen *OmpA*-vermittelten Transport des Fusionsproteins ins Periplasma zurückzuführen, da das rekombinante Protein immer in der cytoplasmatischen Fraktion verblieb. Der Transport ins Periplasma entzöge das Protein dem Abbau durch cytoplasmatische Proteasen. Die stabilisierende Auswirkung von Genfusionen auf das Genprodukt wurde bereits mehrfach beschrieben (u.a. Shen, S-H., 1984; Bowie and Sauer, 1989; Koken et al., 1993). Die Expression im *E. coli* Stamm XL1-Blue ergab jedoch fast vollständig unlösliches Fusionsprotein. Die Tatsache, dass das rekombinante Protein aggregiert in Membraneinschlüssen (*inclusion bodies*) vorlag, und somit vor Proteasen geschützt war, erklärt die Stabilität des Fusionsproteins gegenüber proteolytischem Abbau.

In dem zuvor bereits verwendeten Stamm BL21(DE3) dagegen war ein signifikanter Anteil des Fusionsproteins löslich, allerdings trat dabei wieder ein teilweiser proteolytischer Abbau des Genprodukts auf. Der Grad der Proteolyse war jedoch deutlich geringer als bei den Expressionsstudien mit dem pET-Expressionssystem. Allerdings hatte das so exprimierte Protein keinerlei Affinität zu den Affinitätsmatrices StrepTactin oder PKI(5-24). Ein denkbarer Grund für dieses Phänomen wäre eine nichtfunktionelle Faltung des Fusionsproteins. So könnte der Fusionsanteil des *Strep-tag II*-Peptids durch die Faltung maskiert zu sein. Ebenso könnte das aktive Zentrum der C-Untereinheit, das zur Bindung an PKI(5-24)-Peptid benötigt wird, blockiert sein. Da die Bindung an PKI(5-24) von der Aktivität des Enzyms und damit von der Phosphorylierung des Aktivierungssegmentes an Thr197 abhängig ist, ist auch das Fehlen dieser aktivierenden Autophosphorylierung im Fusionsprotein ein möglicher Grund für die mangelnde Bindung an die PKI(5-24)-Matrix. Da ein *Strep-tag II*-Cβ2 Fusionsprotein ohne den *OmpA*-Fusionspartner in BL21(DE3)-Zellen denselben proteolytischen Abbau zeigt wie bei der Expression von Cβ2 mit dem pET-System, lässt sich festhalten, dass die Fusion mit dem *OmpA*-Signalpeptid dazu beiträgt, das Cβ2-Protein vor proteolytischem Abbau zu schützen, jedoch offenbar die Ausbildung einer aktiven Konformation verhindert.

Es ist erstaunlich, dass sich zwar das C β 1-, aber nicht das C β 2-Protein in *E. coli* rekombinant herstellen lässt. Das humane C β 2-Protein, das sich nur in einem Aminosäurerest von seinem bovinen Gegenstück unterscheidet, wird bei der Expression in *E. coli* ebenfalls proteolytisch abgebaut (B. Skalhegg, pers. Mitteilung). Da sich C β 2 und C β 1 nur in ihrem N-Terminus unterscheiden, muss der Unterschied in der Empfindlichkeit gegenüber bakteriellen Proteasen in dem 62 AS großen C β 2-spezifischen N-Terminus begründet liegen. Möglicherweise bildet dieser eine eigene Domäne, in der der Übergang vom N-Terminus zum übrigen Protein besonders empfindlich gegenüber proteolytischer Spaltung durch bakterielle Proteasen ist. Dies ist beispielsweise auch bei der regulatorischen Untereinheit RI α der Fall, bei welcher die die Aminosäurereste 1-91 umfassende N-terminale Domäne besonders empfindlich gegen proteolytische Spaltung ist (Potter et al., 1978).

4.2.3 Expression von Cβ2 in Sf9-Insektenzellen

Wenn die Expression eines heterologen Proteins in *E. coli* nicht erfolgreich ist, kann häufig die Verwendung eines eukaryotischen Expressionssystems helfen. So wurde im Falle von Ser/Thr-Kinasen das Baculovirus-Expressionssystem mehrfach erfolgreich angewendet (u.a. Brickey et al., 1990; Feil et al., 1993; Cabell et al., 1996). Auch in der vorliegenden Arbeit erwies sich die Expression von C β 2 in Sf9-Zellen mittels rekombinanter Baculoviren als die Methode der Wahl. Die Identität des Proteins konnte über mehrere unabhängige Methoden gezeigt werden. Im Lysat von Sf9 Zellen, die mit rekombinanten AcNPV-Cβ2 Baculoviren infiziert wurden, konnte ein Protein der erwarteten Größe von 46 kDa mit einem Cβ2-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden, nicht jedoch in uninfizierten Zellen. Das Lysat dieser Zellen wies des weiteren gegenüber nichtinfizierten Zellen eine um das Zehnfache erhöhte Kinaseaktivität gegenüber dem Peptid Kemptid auf, ein typisches Substrat katalytischer Untereinheiten der PKA. Das 46 kDa Protein bindet MgATP-abhängig an PKI(5-24)-Peptid und konnte so bis zur Homogenität gereinigt werden. Letztlich konnte die Identität und Integrität des Proteins über Elektrospray-Ionen Massenspektrometrie als Cβ2 bestätigt werden.

Im Gegensatz zur bakteriellen Expression zeigt sich, dass das CB2-Protein während der Expression in Sf9 Zellen nur geringfügiger Proteolyse unterworfen war, eine Bestätigung der Vermutung, dass eine bakterielle Protease den Abbau in E. coli BL21(DE3) verursachte. Auffallend war eine morphologische Veränderung einiger Sf9 Insektenzellen während der Expression. Es bildeten sich filamentöse Fortsätze aus, die teilweise noch cytoplasmatische Einschlüsse enthielten. Ein solches Phänomen wurde bereits bei der rekombinanten Expression einer katalytischen Untereinheit der PKA aus der Meeresschnecke Aplysia in Sf9 Insektenzellen beschrieben (Cheley et al., 1992). Es ist anzunehmen, dass dieses Verhalten auf die erhöhte Kinaseaktivität in den infizierten Zellen zurückzuführen ist, da diese Morphologie mit keiner anderen bei Baculovirusexpressionen beobachteten Veränderung übereinstimmt. Es lässt sich jedoch eine gewisse Ähnlichkeit feststellen zur Morphologie von CHO-Zellen, die mit cAMP-Analoga behandelt wurden. Die daraus resultierende Aktivierung der PKA führt u.a. dazu, dass die Zellen aus einer rundlichen Form in eine spindelförmige, fibroblastenähnliche übergehen (Hsie and Puck, 1971). Diese morphologische Veränderung konnte auch durch die Überexpression von Cβ2 in der PKA-defizienten CHO₁₀₂₆₀-Zellinie hervorgerufen werden (Thullner et al., 2000).

Die Optimierung der Expression im Hinblick auf die Menge an eingesetzten Viren zeigte, dass die MOI, die zur Infektion verwendet wird, nur von untergeordneter Bedeutung ist. Von den getesteten MOIs zeigte sich ein Maximum bei einer MOI von 5, also einem fünffachen Überschuss von Viren zu Sf9-Zellen. Häufig ist eine höhere MOI von Vorteil, da so eine gleichmäßige Infektion aller Zellen und damit ein Höhepunkt der Proteinexpression zu einem definierten Zeitpunkt besser zu gewährleisten ist. Dies war bei der C β 2-Expression nicht der Fall. Eine Erhöhung der MOI auf 10 ging nicht mit einer entsprechenden Erhöhung der Ausbeute einher, während eine Verringerung auf eine MOI=1 die Ausbeute nicht dramatisch verringerte. Auch diese Beobachtung könnte auf die dauerhafte Kinaseaktivität zurückgeführt werden, die für die Zelle schädlich ist, so dass zu einem gewissen Zeitpunkt ein Maximum der Proteinsynthese erreicht ist.

Bei der Expression eines eukaryotischen Gens in eukaryotischen Zellen ist stets die mögliche Existenz eines homologen endogenen Genes in Betracht zu ziehen, dessen Genprodukt bei der Reinigung des rekombinanten Proteins als Kontaminante auftreten kann. Bislang ist noch keine Isoform der PKA in Sf9-Zellen beschrieben worden, es gibt jedoch Untersuchungen, die auf die Existenz einer cAMP-abhängigen Kinaseaktivität in diesen Zellen hindeuten (Siow et al., 1992). Für Drosophila wurde bereits eine katalytische Untereinheit der PKA mit 82% Homologie zur murinen C α -Untereinheit beschrieben (Kalderon and Rubin, 1988). Im Lysat uninfizierter Sf9-Zellen konnte zumindest mit dem C β -spezifischen anti-C β (35-46) Antikörper keine Cβ-Isoform nachgewiesen werden. Auch bei den weiteren Untersuchungen konnte in C
^β2-Pr
^äparationen aus Sf
⁹-Zellen kein Hinweis auf eine Verunreinigung durch endogene C-Untereinheiten festgestellt werden, weder im Immunoblot, noch in der ESI-Massenspektrometrie. Aufgrund der Konserviertheit der C-Untereinheiten wäre zumindest die Bindung einer endogenen C-Untereinheit an eine PKI(5-24)-Affinitätssäule zu erwarten. Nach einer PKI(5-24)-Affinitätschromatographie mit Lysat aus uninfizierten Sf9 Zellen konnte im Immunoblot erst nach langer Expositionsdauer eine schwache Bande nachgewiesen werden. In Cβ2-exprimierenden Zellen trat diese Bande jedoch nicht auf. Eine denkbare Erklärung für die Abwesenheit einer solchen endogenen C-Untereinheit ist, dass die Wirtsproteinsynthese in Sf9 Zellen nach der Infektion mit Baculoviren drastisch reduziert wird, da der gesamte Proteinsyntheseapparat auf die Produktion viraler Proteine umgestellt wird. Zusätzlich könnte die Synthese einer endogenen PKA durch die Überexpression einer heterologen C-Untereinheit weiter herunterreguliert werden, so dass die evtl. noch vorhandene endogene PKA, die daneben auch dem normalen Protein-Turnover unterliegt, angesichts der Menge an heterologer C-Untereinheit keine Rolle mehr spielt.

Ein Vorteil rekombinanter Genexpression in Sf9-Zellen ist die in vielen Fällen korrekte posttranslationale Modifikation des rekombinanten Genproduktes. Im Gegensatz zur Expression von C α und C β 1 in *E. coli*, bei der eine Hyperphosphorylierung des Enzyms auftritt (s.o.), konnten bei der Expression von C β 2 in Sf9-Zellen nur einfach und zweifach phosphorylierte Isoformen über ESI-MS identifiziert werden (Abbildung 21). Dabei war es unerwartet, dass eine einfach phosphorylierte Form isoliert werden konnte, da die Phosphorylierung an Thr244 im Aktivierungssegment und an Ser385 am C-Terminus als essentielle Phosphorylierungen gelten (entsprechend Thr197 bzw. Ser338 in C α /C β 1). Diese beiden Aminosäurereste sind auch in gereinigtem nativem Enzym aus Rinderherz stets phosphoryliert (Thullner et al., 2000). Allerdings ließ sich in der hochaufgelösten Kristallstruktur des Ca-Enzyms ebenfalls keine Ser338-Phosphorylierung nachweisen (Bossemeyer et al., 1993), wobei jedoch eine erhöhte Mobilität dieser Phosphatgruppe im Kristall die Abwesenheit von Elektronendichte in der Phosphatposition vorgetäuscht haben könnte, da biochemisch dennoch 2 mol Phosphat pro mol Protein detektiert wurden. Mutagenesen von vier Autophosphorylierungsstellen der rekombinanten Ca-Untereinheit zeigten, dass die C-terminale Phosphorylierungsstelle an Ser338 (Ser385 in Cβ2) wichtig für die Stabilität des Enzyms ist, jedoch die kinetischen Eigenschaften des Enzyms kaum verändert (Yonemoto et al., 1997). Die Phosphorylierung an Thr197 (Thr244 in Cb2) ist dagegen absolut notwendig für die katalytische Aktivität des Enzyms. Da zu erwarten ist, dass auch im Falle von CB2 eine katalytisch aktive Konformation die Voraussetzung für eine Reinigung über PKI(5-24)-Affinitätschromatographie ist, sollte die einfach phosphorylierte Form an Thr244 phosphoryliert sein und dementsprechend die Ser385-Phosphorylierung fehlen. Es ist durchaus vorstellbar, dass es Isoformen gibt, die nicht an Thr244 phosphoryliert sind, diese wären nach den Erfahrungen mit C α jedoch inaktiv und würden daher bei der PKI(5-24)-Affinitätschromatographie nicht erfasst.

Es ist wenig wahrscheinlich, dass das Fehlen des Serinphosphats an Position 385 auf die Aktivität von Phosphatasen zurückzuführen ist. da die korrespondierende Phosphorylierungsstelle in der C α -Untereinheit – genau wie das Threoninphosphat im Aktivierungssegment - sehr stabil gegen Phosphataseeinwirkung ist (Shoji et al., 1979). Daher ist anzunehmen, dass diese Autophosphorylierung in einer Subpopulation des gereinigten CB2-Proteins nicht erfolgt ist. Es ist unklar, warum in *E. coli* eine Hyperphosphorylierung erfolgt, in Sf9-Zellen jedoch nicht, wenn man von einem identischen Mechanismus ausgeht. Wahrscheinlich wird die C-Untereinheit in vivo durch eine andere Proteinkinase aktivierend phosphoryliert (Cauthron et al., 1998), vermutlich von der Phosphoinositid-abhängigen Kinase PDK1 (Moore et al., 2002). Es ist jedoch fraglich, ob dies auch in Sf9-Zellen möglich ist, insbesondere in Anbetracht der Tatsache, dass die Wirtsproteinsynthese praktisch zum Erliegen kommt. Daher ist die intermolekulare Autophosphorylierung auch hier als wahrscheinlicher Aktivierungsmechanismus anzunehmen. Dabei üben jedoch möglicherweise endogene regulatorische Untereinheiten und Proteinphosphatasen eine inhibitorische Funktion aus, so dass der Phosphorylierungsgrad geringer ist als in E. coli.

Die hier beschriebene Expression des C β 2-Proteins in Sf9-Insektenzellen ist die bisher einzige erfolgreiche Methode zur rekombinanten Expression dieses Proteins in löslicher, aktiver Form. Die C β 2-Isoform konnte so erstmals getrennt von anderen C-Untereinheiten

122

dargestellt werden. Damit sind die Grundvoraussetzungen zur weiteren Charakterisierung dieser ungewöhnlichen C-Untereinheit erfüllt.

4.3 Vergleichende biochemische Charakterisierung der C β -Untereinheiten

4.3.1 C α , C β 1 und C β 2 unterscheiden sich in ihren kinetischen Konstanten

Mit der rekombinanten Expression von C β 1 und C β 2 war es nun erstmals möglich, die C β -Isoformen einer vergleichenden biochemischen Charakterisierung zu unterziehen. Zunächst wurde in Aktivitätsassays die Kinetik der Phosphorylierung des Peptidsubstrates Kemptid im Vergleich zur Cα-Untereinheit untersucht. Es wurden Micheliskonstanten (K_M) für Kemptid und das Kosubstrat ATP, sowie die Maximalgeschwindigkeit (v_{MAX}) für die Phosphorylierungsreaktion bestimmt. Dabei wurden für beide Cß-Untereinheiten um den Faktor 2-3 höhere Michaeliskonstanten als für C α ermittelt, sowohl im Falle von Kemptid als auch für ATP. Auch die Maximalgeschwindigkeit lag bei beiden Cβ-Untereinheiten höher als bei C α (vgl. Tab. 2). Dieser Befund stimmt teilweise mit den für murine C β 1- und C α -Isoformen veröffentlichten Messungen überein (Gamm et al., 1996), in denen für CB1 ein etwa doppelter so hoher K_M -Wert für Kemptid beobachtet wurde, wie für C α . Gamm et al. konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede im K_M-Wert für ATP und der Maximalgeschwindigkeit der Reaktion feststellen. Dies mag in den Unterschieden zwischen bovinen und murinen C-Untereinheiten begründet liegen, die sich bereits bei der Antikörpererkennung zeigten (4.1), und sich auch dadurch bemerkbar machen, dass murine $C\alpha$ - und C β 1-Untereinheit in SDS-Polyacrylamidgelen ein unterschiedliches Laufverhalten zeigen, die bovinen Isoformen dagegen nicht (Gamm et al., 1996, Thullner et. al. 2000).

Die höheren Michaeliskonstanten der C β -Isoformen für Kemptid und ATP haben zur Folge, dass unter Bedingungen einer Substratlimitierung das Kemptid bevorzugt von der C α -Untereinheit phosphoryliert würde. Die höhere Maximalgeschwindigkeit der Reaktion bei den C β -Isoformen zeigt aber auch, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Phosphorylierungsreaktion, nämlich die Produktfreisetzung, sowohl bei C β 1 als auch bei C β 2 schneller vonstatten geht als bei C α . Dies würde bedeuten, dass bei hohen Substratkonzentrationen die C β -Isoformen effizienter arbeiten können als C α .

Es zeigten sich jedoch nicht nur Unterschiede zwischen C α - und C β -Isoformen, sondern auch zwischen C β 1 und C β 2. So wurde für C β 1 eine etwa doppelt so hohe Michaeliskonstante für Kemptid bestimmt wie in Falle von C β 2, auch die Maximalgeschwindigkeit war für C β 1 um den Faktor zwei höher. Die Michaeliskonstanten für ATP unterschieden sich dagegen nicht signifikant. Da sich C β 1 und C β 2 nur durch den vom jeweiligen Exon 1 codierten N-Terminus unterscheiden, ist es sehr wahrscheinlich, dass dieser N-Terminus für die beobachteten Unterschiede von Bedeutung ist. Da der N-Terminus auf der dem katalytischen Zentrum abgewandten Teil des Proteins lokalisiert ist, ist ein direkter Einfluss auf die katalytische Aktivität oder die Interaktion mit dem Peptidsubstrat unwahrscheinlich. Denkbar ist jedoch, dass dies indirekt über Unterschiede in der Tertiärstruktur geschieht, die durch die unterschiedlichen N-Termini hervorgerufen werden. Aufschluss über solche subtilen Unterschiede können letztendlich nur Kristallstrukturuntersuchungen geben.

4.3.2 C β 1 und C β 2 zeigen keine Unterschiede in der Inhibition durch PKI(5-24) und RII α

Neben der MgATP-abhängigen Kemptidphosphorylierung ist die Inhibition der Kinaseaktivität durch den hitzestabilen Proteinkinaseinhibitor PKI und durch regulatorische Untereinheiten ein Charakteristikum für katalytische Untereinheiten der PKA. Für die murine C β 1-Untereinheit wurde dies bereits bestätigt (Gamm et al., 1996), im Rahmen dieser Arbeit konnte dies für die bovine C β 1-Untereinheit und erstmals auch direkt für die C β 2-Untereinheit gezeigt werden.

Der Verlauf der Inhibition war für C β 1 und C β 2 sowohl bei Verwendung des PKI(5-24)-Peptides als auch der RII α -Untereinheit fast identisch. Der im vorherigen Abschnitt diskutierte mögliche Einfluss der C β N-Termini auf die Tertiärstruktur und die Kinetik der Phosphorylierung von Kemptid würde sich damit nicht auf die Interaktion mit den PKAspezifischen Inhibitoren auswirken. Dies könnte als ein Hinweis auf die starke Konservierung der R-C und C-PKI Interaktionen interpretiert werden und unterstreicht damit die Notwendigkeit einer strengen Regulation der katalytischen Aktivität der PKA in der Zelle.

4.3.3 Interaktionsmessungen mit Oberflächenplasmonresonanz zeigen eine höhere Affinität der C β -Untereinheiten zu RI α und RII α

Die Interaktionsmessungen mittels Oberflächenplasmonresonanz erlaubten eine genauere Untersuchung und Bewertung der Wechselwirkung zwischen den C β -Untereinheiten und den regulatorischen Untereinheiten der PKA im Vergleich zu C α . Zunächst einmal konnte mit dieser Methode festgestellt werden, dass sowohl C β 1 als auch C β 2 mit allen vier regulatorischen Untereinheiten (RI α , RII α , RII β , RII β) interagieren und sich damit wie charakteristische katalytische Untereinheiten der PKA verhalten, was die zuvor erhobenen Befunde bestätigt.

Weitere Aufschlüsse gab die kinetische Analyse der Interaktion mit der RI α und RII α -Untereinheit. Hierzu ist anzumerken, dass es aufgrund der Instabilität der C β -Untereinheiten im Immobilisierungspuffer nicht möglich war, bei unterschiedlichen Messungen eine einheitliche Belegung der Sensoroberfläche zu erreichen. Somit sind die bei unterschiedlichen Messungen erhobenen kinetischen Daten zwar nicht direkt vergleichbar, innerhalb einer Messreihe mit der gleichen Sensoroberfläche ist dies jedoch gewährleistet.

Die SPR-Messungen der Interaktion der C-Untereinheiten mit RI α ergaben für C β 1 und C β 2 einen K_D-Wert von 0,16 bzw. 0,3 nM verglichen mit 0,7 nM für C α . Die Bindung der C β -Isoformen an die RI α -Untereinheit scheint also um den Faktor 2-4 affiner zu sein als die Bindung von C α . Die niedrigeren K_D.Werte resultierten hauptsächlich aus der geringeren Dissoziationsgeschwindigkeit der C β -Isoformen verglichen mit C α (Abbildung 28, Tabelle 3). C β 1 zeigte darüber hinaus eine schnellere Assoziation mit RI α als C α und C β 2.

Diese Tendenz zeigte sich auch bei der Interaktion der C-Untereinheiten mit der RII α -Untereinheit. Auch hier zeigten C β 1 und C β 2 verglichen mit C α eine verlangsamte Dissoziation und daraus resultierend einen niedrigeren K_D-Wert als C α .

Dies ist ein Hinweis darauf, dass C β 1 und C β 2 in der Zelle möglicherweise schneller und effizienter durch RI α und RII α inhibiert werden als C α . Gamm et al. (1996) konnten zeigen, dass C β 1/RII α -Holoenzyme durch geringere cAMP-Konzentrationen aktiviert werden als C α /RII α -Holoenzyme. Das würde bedeuten, dass bei einer Erhöhung des cAMP-Spiegels in der Zelle bevorzugt C β -Isoformen aktiviert würden. Erst bei höheren cAMP-Konzentrationen würden dann auch Holoenzyme mit C α -Untereinheiten aktiviert. Ein solcher Effekt könnte durch die R-Untereinheit im Holoenzymkomplex weiter moduliert werden, da z.B. RI β eine niedrigere Aktivierungskonstante für cAMP aufweist als die übrigen Isoformen (Cadd et al, 1990). Demnach würden RI β /C β -Holoenzyme die höchste Sensitivität gegenüber cAMP aufweisen. Bei einem Absinken des cAMP-Spiegels wiederum würden dann zunächst die C β -Isoformen aufgrund der höheren Affinität bevorzugt von R-Untereinheiten gebunden und inaktiviert, während die C α -Untereinheiten weiterhin aktiv blieben.

Dies könnte man so deuten, dass die Cβ-Untereinheiten in der Zelle für das Anschalten spezifischer Signalwege verantwortlich sind, die bereits bei geringen cAMP-Konzentrationen aktiviert werden, die jedoch auch rasch wieder inaktiviert werden müssen. Eine weitere Ebene der Regulation könnte dabei durch die subzelluläre Lokalisation erfolgen. So könnten über A-Kinase Ankerproteinen (AKAPs) beispielsweise lokale Ansammlungen von Cβ-Isoformen enthaltenen Holoenzymen geschaffen werden, die durch lokale Erhöhungen des cAMP-Spiegels aktiviert werden.

Auch die Oberflächenplasmonresonanzmessungen mit GST-PKI als Interaktionspartner lassen den Messungen trat eine Massentransportlimitierung auf, die bei sehr schnellen Assoziationen zu beobachten ist. Bei diesem Phänomen ist die Bindung der Analytmoleküle an die Matrix schneller als die Diffusion des Analyten aus der mobilen Phase des laminaren Flusses in die stationäre Phase an der Sensoroberfläche. Daher sind die gemessenen Bindungskinetiken nicht mehr durch die Bindungskonstanten der Protein-Protein-Interaktion limitiert, sondern durch die Diffusionsrate des Analyten von und zur Sensoroberfläche. Dieser Effekt verlangsamt sowohl die Assoziations- als auch die Dissoziationsphase, da Analytmoleküle zum einen nicht schnell genug zur Oberfläche hin gelangen, zum anderen aber auch nach der Dissoziation nicht schnell genug wieder in die Flussphase übertreten und dann für eine erneute Bindung zur Verfügung stehen können (Herberg and Zimmermann, 1999). Prinzipiell kann diese Limitation durch eine geringere Oberflächendichte des Liganden und/oder eine geringere Flussrate gemildert oder ganz aufgehoben werden; mittlerweile gibt es jedoch auch fortgeschrittene Modelle, welche die Berechnung der Bindungskonstanten unter Berücksichtigung der Massentransportlimitierung erlauben (Myszka et al., 1998).

Die so berechneten Gleichgewichtsbindungskonstanten für C β 1 und C β 2 unterscheiden sich nur geringfügig und bestätigen damit die zuvor mit dem PKI(5-24)-Peptid gemachten Inhibitionsstudien. Der C β 2-spezifische N-Terminus hat also offenbar keinen Einfluss auf die Bindung an das GST-PKI-Fusionsprotein. Die Affinität der C β -Untereinheiten für GST-PKI ist dabei mindestens so hoch wie die der C α -Untereinheit, möglicherweise etwas höher (F.W. Herberg, pers. Mitteilung). Das PKI-Protein ist für die Inhibition der C-Untereinheiten im Zellkern und deren raschen Export ins Cytoplasma verantwortlich (Fantozzi et al., 1994, Wen et al., 1995a). Es liegt daher nahe anzunehmen, dass sowohl C β 1 als auch C β 2 - wie C α Substrate im Kern phosphorylieren können und dabei der Regulation durch PKI unterliegen. Eine Kernlokalisation des C β 2-Proteins konnte bereits in vorhergehenden Immunfluoreszenzuntersuchungen an CHO-Zellen und in Kernextrakten aus HeLa Zellen gezeigt werden (Thullner et al., 2000). Da C β 2 wie auch C α und C β 1 nicht über ein typisches Kernlokalisationssignal verfügt, ist es wahrscheinlich, dass die Translokation in den Kern trotz des höheren Molekulargewichtes wie bei C α über freie Diffusion erfolgt (Haarotunian et al, 1993, Picciolo, 2001).

4.4 C β 1 und C β 2 zeigen Unterschiede zu C α in der Phosphorylierung einzelner Substrate der PKA

Die Existenz verschiedener Isoformen der katalytischen Untereinheit der PKA wirft die Frage auf, ob diese Diversität auch mit einer Substratspezifität der verschiedenen Untereinheiten einhergeht. Die Identifizierung eines isoformspezifischen Substrates steht jedoch bislang noch aus. Spezifische Funktionen für C β 1 bei der Gedächtnisbildung und bei Lernprozessen konnten in Mäusen mit einer gezielten Deletion im C β 1-Gen gezeigt werden (Huang et al., 1995, Qi et al., 1996). In einer neuere Studie mit *"knock-out"* Mäusen, bei denen alle C β -Isoformen in der Maus deletiert wurden, konnte ebenfalls ein Einfluss auf die Gedächtnisbildung nachgewiesen werden, der jedoch vom verwendeten Mausstamm abhängig war (Howe et al., 2002).

Bei der Untersuchung der Isoformen in dieser Arbeit wurden verschiedene bekannte Substrate für die PKA auf die Phosphorylierung durch C α , C β 1 und C β 2 hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass der Transkriptionsfaktor CREB, welcher durch die C α -Untereinheit an Ser133 phosphoryliert wird (Gonzalez and Montminy, 1989), für alle drei Isoformen ein gleich gutes Substrat zu sein scheint. Dies deckt sich mit der zuvor geäußerten Vermutung, dass neben C α auch C β 1 und C β 2 Substratproteine im Kern phosphorylieren und damit auch der Regulation durch PKI unterliegen. Unterschiede zeigen sich dagegen bei der Phosphorylierung des basischen Myelinproteins (MBP, *Myelin Basic protein*), das ein Bestandteil der Myelinscheide um die Axone der Neuronen in Wirbeltieren ist. MBP wurde durch die C β -Untereinheiten deutlich schwächer phosphoryliert als durch C α , wobei die Phosphorylierung durch Cβ2 nochmals schwächer war, als die durch Cβ1. MBP kann von Cα *in vitro* an insgesamt acht Positionen phosphoryliert werden (Kishimoto et al., 1985), und stellt daher ein gutes Modellsubstrat dar. Es ist allerdings noch unklar, ob diese Phosphorylierungen auch *in vivo* von Bedeutung sind, da die vorherrschende Phosphorylierungsstelle *in vivo*, Thr97, durch die Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) phosphoryliert wird, nicht aber durch die PKA (Erickson et al., 1990, Kishimoto et al., 1985). Möglicherweise beruht der gute Substratcharakter von MBP *in vitro* auf der großen Zahl basischer Reste, die das Auftreten einer PKA-Konsensussequenz sehr wahrscheinlich machen. Dennoch zeigen die hier beobachteten Unterschiede in der Phosphorylierung, dass es Unterschiede in der Erkennung von MBP als Substrat zwischen den drei Isoformen geben muss, deren Natur jedoch zu klären bleibt.

Ein unerwartetes Bild ergab sich bei der Verwendung verschiedener Histonpräparationen als Substrat. Wie bei MBP handelt es sich auch bei den Histonen um stark basische Proteine, die aufgrund dessen auch eine hohe Zahl an Phosphorylierungsstellen für die PKA tragen. Sie werden daher bereits seit langer Zeit als Modellsubstrat für die PKA eingesetzt. Bei der Phosphorylierung einer Präparation von Kern-Histonen der Firma Roche ergab sich demgemäss ein deutliches Phosphorylierungssignal bei allen drei Isoformen. Wurde jedoch eine Histonpräparation der Firma Sigma als Substrat eingesetzt, so zeigte sich bei C β 1 und C β 2 im Gegensatz zu C α nur eine sehr schwache Phosphorylierung, wobei alle unterschiedlichen Histone in der Präparation durch die C β -Untereinheiten in gleichem Maße geringer phosphoryliert wurden. Da beide Histonpräparationen prinzipiell die gleichen Histonspezies enthalten (H1, H2A, H2B, H3, H4), wenn auch möglicherweise nicht in identischen Anteilen, ist es daher fraglich, ob es sich bei dem Phänomen um eine unterschiedlicher Substraterkennung handelt, oder die Ursache eine inhibitorische Aktivität in der Histon IIAS Präparation ist.

4.4.1 Die Histon IIAS-Präparation enthält einen Cβ-spezifischen Inhibitor mit Proteincharakter

Um die These zu überprüfen, dass hier eine C β -spezifische Inhibition vorliegt, wurde Histon IIAS in steigenden Konzentrationen in Phosphorylierungsassays mit MBP als Substrat eingesetzt. Während Histon IIAS auf die MBP-Phosphorylierung durch C α keinen nennenswerten Einfluss zeigte, wurde die C β 1- bzw. C β 2-vermittelte MBP- Phosphorylierung durch HistonIIAS stark verringert. Dieser Befund konnte mit dem atrialen natriuretischen

Peptid (ANP) als Substrat bestätigt werden. Steigende Histon IIAS Konzentrationen schwächten die ANP-Phosphorylierung durch die C β -Untereinheiten zunehmend ab, nicht jedoch die Phosphorylierung durch C α . Diese Ergebnisse zeigen, dass es sich bei der beobachteten Inhibition um ein C β -spezifisches Phänomen handelt. Offenbar enthält die HistonIIAS Präparation eine inhibitorische Aktivität, welche C β 1 und C β 2 betrifft, nicht aber die C α -Untereinheit. Dies wird durch die in früheren Untersuchungen gemachte Beobachtung, dass Histon IIAS in Renaturierungsgelen für C β 2 ein schlechteres Substrat zu sein scheint als für C α , unterstützt (Thullner, 1997). Über die Phosphorylierung von Histonen durch C β 1 war bislang nichts bekannt.

Die Natur der inhibitorischen Aktivität konnte durch weitere Untersuchungen eingegrenzt werden. Es bestand die Möglichkeit, dass in der Histon IIAS-Präparation niedermolekulare Bestandteile wie z.B. Metallionen oder Salze enthalten sind, welche die Kinaseaktivität von C β 1 und C β 2 negativ beeinflussen. Da jedoch auch nach einer Gelfiltration mit einer Ausschlussgrenze von etwa 5000 Da, durch die niedermolekulare Bestandteile abgetrennt wurden, die inhibitorische Aktivität bestehen blieb, konnte diese Vermutung ausgeschlossen werden.

Da sich C β 2 bereits zuvor als sehr empfindlich gegenüber Proteolyse erwiesen hatte, wurde auch die Anwesenheit einer Protease als möglicher Grund für die verringerte Aktivität der C β -Untereinheiten in Betracht gezogen. Die Analyse der Integrität der C-Untereinheiten im Immunoblot nach längerer Inkubation mit Histon IIAS ergab jedoch keinerlei Hinweise auf eine proteolytische Aktivität in der Histon IIAS-Präparation, so dass auch dieser Faktor ausgeschlossen werden konnte.

In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die inhibitorische Aktivität in Histon IIAS sensitiv gegenüber Trypsin- und Hitzebehandlung ist, beides ein deutlicher Hinweis auf ein Protein als möglichen inhibitorischen Faktor. Aufgrund der Hitzeempfindlichkeit ist es unwahrscheinlich, dass es sich dabei um ein mögliches C β spezifisches PKI-Protein handelt, da PKI sich durch seine besondere Hitzestabilität auszeichnet.

4.4.2 H3 zeigt als einziges Histon deutliche Unterschiede in der Phosphorylierung durch die C-Untereinheiten

Der Befund, dass es sich bei dem vermuteten Inhibitor wahrscheinlich um ein Protein handelt, legte zunächst einmal die in Histon IIAS enthaltenen Histonspezies als mögliche Verursacher nahe. Um dies zu überprüfen, wurden Präparationen der Histone H1, H2A, H2B, H3 und H4 auf Unterschiede in der Phosphorylierung durch C α , C β 1 und C β 2 hin untersucht. Dabei zeigte sich einzig im Falle von Histon H3 ein deutlicher Unterschied. Zwar gab es auch bei der H1-Phosphorylierung Unterschiede in der Stärke der Phosphorylierung, aufgrund des nur Signals liegen diese aber möglicherweise in der biologischen sehr geringen Schwankungsbreite des Experiments. Im Falle von Histon H3 zeigte sich jedoch zusätzlich eine Übereinstimmung mit den Erkenntnissen aus den vorherigen Inhibitionsversuchen darin, dass sowohl C\u00b31 als auch C\u00b32 Histon H3 schwächer phosphorylieren als C\u00a2. Erneut kann dieses Phänomen auf eine unterschiedliche Substratspezifität oder aber eine Inhibition der CB-Untereinheiten zurückzuführen sein.

4.4.3 Die inhibitorische Aktivität in Histon IIAS-Präparationen ist auf ein noch unbekanntes Protein zurückzuführen.

Um die Frage zu klären, ob es sich bei der verminderten H3 Phosphorylierung um den gleichen inhibitorischen Effekt handelt, der schon mit der Histon IIAS-Präparation zu beobachten war, wurde der Einfluss von Histon H3 auf die ANP-Phosphorylierung durch C β 1 und C β 2 inhibiert, ist ein ähnliches Bild zu erwarten, falls Histon H3 der gesuchte Inhibitor ist, oder die H3-Präparation den Inhibitor enthält. Tatsächlich bestätigte sich zwar, dass Histon H3 von beiden C β -Untereinheiten schwächer phosphoryliert wird, als von C α , die ANP-Phosphorylierung war jedoch in Gegenwart von Histon H3 nicht oder nur geringfügig beeinträchtigt. Folglich handelt es sich es um zwei unabhängige Phänomene: zum einen ist Histon H3 für C β 1 und C β 2 ein schlechteres Substrat als für C α , zum anderen enthält die Histon IIAS-Präparation offenbar ein noch zu identifizierendes Protein, welches die Phosphorylierung von Substraten wie Histon, MBP und ANP durch die C β -Untereinheiten inhibiert.

Inwieweit die unterschiedliche Substratspezifität der C-Untereinheiten gegenüber Histon H3 von biologischer Bedeutung sein kann, ist unklar. Wie auch das Basische Myelinprotein MBP tragen die Histone aufgrund ihrer Vielzahl an basischen Resten mehrere PKA-Konsensussequenzen, welche sich durch ein oder zwei basische Reste vor der Phosphoakzeptoraminosäure auszeichnen. Ob die Histone tatsächlich in vivo Substrate sind, ist umstritten, zumindest für Histon H3 und H1 erscheint dies aber wahrscheinlich (DeManno et al, 1999). So konnten DeManno et al. zeigen, dass die FSH-stimulierte H3 Phosphorylierung an Ser10 in Granulosazellen der Ratte mit einer Aktivierung der cAMPabhängigen Proteinkinase und der Translokation katalytischer Untereinheiten in den Zellkern einhergeht. Darüber hinaus konnte diese Phosphorylierung durch Forskolin und 8-bromocAMP, die beide den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhen, stimuliert und durch H89, einen PKA-Inhibitor inhibiert werden (De Manno et al., 1999). In einer anderen Studie zeigte sich, dass die durch Gliotoxin-Behandlung hervorgerufene Apoptose in Thymocyten mit erhöhter PKA-Aktivität und einer Phosphorylierung von Histon H3 an Ser10 verbunden ist. Die Apoptose konnte durch Vorinkubation der Zellen mit PKI(5-24) inhibiert werden (Waring et al., 1997).

DeManno et al. schlagen ein Modell vor, wonach die katalytischen Untereinheiten der PKA nach FSH-Stimulation im Zellkern sowohl den Transkriptionsfaktor CREB, als auch Histon H3 sowie H1 phosphorylieren und dadurch zur Transkriptionsaktivierung der FSH-aktivierten Gene beitragen (DeManno et al., 1999). Sowohl CREB als auch die Histone H1 und H3 wurden in dieser Arbeit als Substrate für C β 1 und C β 2 identifiziert. Die niedrigere Phosphorylierungsrate von Histon H3 durch die C β -Untereinheiten könnte sich in einem möglichen regulatorischen Effekt auswirken, wenn überwiegend C β -Untereinheit im Zellkern vorhanden wäre. Obwohl C α die Hauptisoform darstellt, könnten lokal höhere C β -Konzentrationen beispielsweise durch die Lokalisation über AKAPs erreicht werden. Auch der Befund von Gamm et al., dass RII α /C β 1-Holoenzyme bei niedrigeren intrazellulären cAMP-Konzentrationen aktiviert werden als RII α /C α -Holoenzyme (Gamm et al., 1996), könnte bei einem niedrigen Stimulus der Zelle zu einem vergleichbaren Effekt führen, indem bevorzugt C β 1-Untereinheiten aktiviert werden.

Das Beispiel der Histon H3 Phosphorylierung bestätigt das bisher gewonnene Bild von sehr differenzierten Unterschieden zwischen den C α - und C β -Isoformen, die sich auch in der noch unbekannten inhibitorischen Aktivität in der Histon IIAS Präparation zeigten. Es konnte jedoch geklärt werden, dass es sich bei diesem Inhibitor um ein Protein, wahrscheinlich aber nicht um eines der Histone handelt.

Dieser noch unbekannte Inhibitor stellt damit das erste Beispiel eines Proteins dar, welches spezifisch mit C β -Untereinheiten, nicht aber mit C α interagiert. Darüber hinaus scheint es sich um einen C β -spezifischen Regulator zu handeln. Eine isoformspezifische Regulation wurde bisher nur bei der katalytischen Untereinheit PrKX gefunden, einer Isoform, die nur von RI-Untereinheiten, nicht aber von RII-Untereinheiten inhibiert wird. Damit verdichten sich immer mehr Hinweise auf eine sehr differenzierte Modulation des cAMP-Signalweges in Abhängigkeit von den beteiligten Isoformen (vgl. auch Abschnitt 4.3.3).

Die Identifizierung des Cβ-spezifischen Inhibitorproteins wird für weitere Untersuchungen dieser Regulation von großer Bedeutung sein. Mittlerweile haben weitergehende Untersuchungen mittels Ionenaustausch-Chromatographie gezeigt, dass die inhibitorische Aktivität von einer MonoS-Säule mit den Histonen ko-eluiert, während auf einer MonoQ-Säule die Histone im Durchlauf zu finden sind, die inhibitorische Aktivität dagegen im Eluat (M. Mohl, persönl. Mitteilung). Dies spricht für ein Protein mit einer negativen Nettoladung, durch die es zu einer Interaktion mit den basischen Resten der Histone kommt. Dies könnte auch die Anwesenheit des Inhibitors in der HistonIIAS Präparation erklären. Auf der MonoQ-Anionenaustauschersäule scheint die Interaktion des Inhibitorische Aktivität mit einer Coomassie-färbbaren Bande in einem SDS-Polyacrylamidgel mit einem geschätzten Molekulargewicht von etwa 30 kDa. Die Identifikation dieser Bande steht jedoch noch aus.

4.5 Möglicher Einfluss von Sequenzunterschieden zwischen C α und C β 1 auf Protein-Protein Interaktionen

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigte sich, dass C α - und C β -Untereinheiten Unterschiede in der Interaktion mit Substraten und regulatorischen Proteinen zeigen. Besonders deutlich wurde dies bei der vorläufigen Charakterisierung eines C β -spezifischen Inhibitors. Aufgrund der hohen Sequenzidentität zwischen C α und C β 1 stellt sich die Frage, wodurch diese Unterschiede hervorgerufen werden können. Ein Sequenzvergleich zwischen C α und C β 1 (siehe Anhang, 7.2) zeigt, dass sich die beiden Proteine in nur 23 ihrer 350 Aminosäurereste unterschieden.

Legt man jedoch die Kristallstruktur der bovinen C α -Untereinheit zugrunde und betrachtet dort die Aminosäuren in denen sich C α von C β 1 unterscheidet, so ergibt sich ein sehr differenziertes Verteilungsmuster. Während die Aminosäureaustausche in der Primärstruktur sowohl am N- wie auch am C-Terminus lokalisiert sind – bei konserviertem katalytischem Kern – treten sie in der Tertiärstruktur gehäuft am oberen Lobus auf der dem katalytischen Spalt abgewandten Seite des Proteins auf (Abbildung 40).

Die auffällige Häufung der Aminosäureaustausche in einem relativ eng begrenzten Bereich ist ein Hinweis auf die Bildung einer Oberfläche für isoformspezifische Interaktionen. Die Aminosäureaustausche befinden sich aber nicht im Bereich der postulierten R-C Interaktion an der Substratbindungsstelle des katalytischen Spalts und der Aktivierungsschleife um Thr197 (Zhao et al., 1998; Tung et al. 2001), so dass ein direkter Einfluss auf die Bindung der R-Untereinheiten dort unwahrscheinlich ist. Eine neuere Mutagenesestudie ergab jedoch Hinweise darauf, dass RI- und RII-Untereinheiten daneben noch weitere, isoformspezifische Interaktionsstellen besitzen (Cheng et al., 2001). Danach scheint die N-terminale Domäne der RI-Untereinheiten zusätzliche Bindungsstellen am oberen, kleinen Lobus der C α -Untereinheit zu haben, die RII-Untereinheiten dagegen am unteren, großen Lobus von C α . Somit wäre ein Einfluss der C β -spezifischen Aminosäurereste auf die RI-Bindung durchaus möglich, was auch die in den Interaktionsmessungen festgestellte höhere Affinität der C β -Untereinheiten zu RI α erklären könnte. Legt man das Modell von Cheng et al zugrunde, ist ein vergleichbarer Einfluss auf die RII-Bindung jedoch eher unwahrscheinlich, da sich die Unterschiede zwischen C α und C β fast ausschließlich auf den kleinen Lobus beschränken.







Abbildung 40: Position der Aminosäureaustausche zwischen C α und C β 1 in der Kristallstruktur der bovinen C α -Untereinheit

Die Darstellungen wurden mit der Software Insight II auf einer Silicon Graphics Workstation erstellt. Gezeigt sind verschiedene Ansichten der C α -Untereinheit, wobei auf der linken Seite jeweils eine Oberflächendarstellung auf der rechten Seite die Sekundärstruktur zu sehen ist. In der Oberflächendarstellung sind Aminosäureaustausche zwischen C α und C β farbig hervorgehoben, die einzelnen Atome sind wie folgt farbcodiert: C - grün, O - rot, N - blau, S - gelb. In der Sekundärstruktur sind α -Helices als gelbe Zylinder, β -Faltblattstrukturen als blaue Pfeile und das Proteinrückgrat als grüner Schlauch dargestellt.

A (vorherige Seite) Rückansicht von C α - A-Helix vorne links, katalytischer Spalt auf abgewandter Seite

B (vorherige Seite) Vorderansicht – Blick auf katalytischen Spalt, A-Helix hinten rechts
Diskussion

Aufschluss über die tatsächlichen Kontaktstellen zwischen R- und C-Untereinheiten können letztlich nur Röntgenkristallstrukturen des Holoenzymkomplexes geben, Daten dieser Art sind bislang jedoch noch nicht verfügbar.

Neben der R-C Interaktion könnte natürlich auch die Interaktion mit anderen Proteinen durch diese Sequenzunterschiede beeinflusst werden. Da die Substratbindungsstelle am katalytischen Spalt bei allen Isoformen der katalytischen Untereinheit stark konserviert ist, ist es wahrscheinlich, dass periphere Regionen für die Substratbindung von Bedeutung sind. So könnten auch die unterschiedlichen Substratspezifitäten von C α - und C β -Isoformen für MBP und Histon H3 erklärt werden. Es ist zu erwarten , dass in Zukunft noch weitere Substrate mit unterschiedlichen Spezifitäten für C α und C β identifiziert werden, da in den hier gezeigten Untersuchungen nur ein sehr begrenztes Spektrum an Substraten getestet wurde.

Auch die Bindung des C β -spezifischen Inhibitors muss letztlich auf diese Sequenzunterschiede zurückzuführen sein, da keinerlei inhibitorische Wirkung auf C α beobachtete werden konnte. Um den genauen Mechanismus der Inhibition zu charakterisieren, muss der Inhibitor zunächst isoliert und identifiziert werden.

Hinweise auf einen C β 2-spezifischen Interaktionspartner konnten mit den hier durchgeführten Untersuchungen nicht gefunden werden. Die Funktion des C β 2-spezifischen N-Terminus bleibt daher weiter unklar. Eine Interaktion mit C β 2-spezifischen Substratproteinen ist ebenso denkbar, wie eine Rolle beim sogenannten "Targeting", also der subzellulären Lokalisierung des Proteins. Ein GST-Fusionsprotein mit den 62 Aminosäureresten des N-Terminus, mit dem mögliche Interaktionspartner in Zelllysaten "gefischt" werden sollten, unterlag einem vergleichbaren proteolytischen Abbau in *E. coli* wie das C β 2-Protein selbst. Um die Funktion des C β 2 N-Terminus aufklären zu können, sind daher weitere Untersuchungen notwendig. Eine Möglichkeit wäre die Expression des angesprochenen GST-Fusionsproteins in Sf9-Zellen, wo ein proteolytischer Abbau möglicherweise vermieden werden könnte. Weiterhin bietet sich die Verwendung des *Yeast Two Hybrid*-Systems mit dem C β 2 N-Terminus im Köderprotein an, um mögliche Interaktionspartner zu identifizieren.

Aufschluss über die Struktur dieses N-Terminus würden letztlich kristallographische Untersuchungen geben. Die wichtigsten Voraussetzungen für die 3D-Strukturaufklärung wurden jetzt erstmalig durch die erfolgreiche Expression und vollständige Reinigung intakten, aktiven Proteins geschaffen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hier gezeigten isoformspezifischen Unterschiede zwischen katalytischen Untereinheit der PKA – sowohl in ihrer Regulation, als auch in ihrer

Substratspezifität – für eine sehr differenzierte Modulation des cAMP-Signalweges sprechen. Um diesen zentralen Signaltransduktionsweg besser verstehen zu können, sind weitere Untersuchungen der verschiedenen Isoformen sowohl der katalytischen als auch der regulatorischen Untereinheiten notwendig, im Hinblick auf Interaktion, Regulation und subzelluläre Lokalisation.

Zusammenfassung

5 Zusammenfassung

Die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) ist das Schlüsselenzym der cAMP-Signalübertragung. Im Ruhezustand bilden die Isoformen der regulatorischen (R) und katalytischen Untereinheiten (C) Heterotetramere, cAMP setzt daraus die aktiven C-Untereinheiten frei. Unser Wissen über die Funktion der C-Untereinheiten basiert fast ausschließlich auf Daten, die an C α erhoben wurden. Über die biochemischen Eigenschaften und die biologische Rolle der Cβ-Isoform und ihrer Spleißvarianten ist nur sehr wenig bekannt. Völlig unklar ist bislang, ob und wie die C
ß-Untereinheiten zur Weichenstellung in der cAMP-Signalkette beitragen können. Die Spleißvariante CB2 unterscheidet sich von CB1 im Exon 1 und ist mit 46 kDa die größte C-Untereinheit in Säugern. In dieser Arbeit konnte mit der Expression in Sf9-Zellen erstmals ein System etabliert werden, das es erlaubt, das CB2-Protein katalytisch aktiv zu gewinnen und homogen zu reinigen. C β 2 wurde biochemisch mit den C α - und C β 1-Untereinheiten vergleichend charakterisiert. Dabei konnte bestätigt werden, dass CB2 wesentliche Eigenschaften einer katalytischen Untereinheit der PKA aufweist. Allerdings unterscheiden sich die drei Isoformen signifikant in ihren katalytischen Konstanten - ein möglicher Ansatzpunkte für eine isoformabhängige Feinregulation der Signalweitergabe. Interaktionsanalysen mittels Oberflächenplasmonresonanz (SPR) zeigten erstmals, dass C\u00b31 und C\u00b32 mit allen Isoformen der R-Untereinheit assoziieren können. Verglichen mit Ca weisen aber sowohl CB1 als auch CB2 verringerte Dissoziationsraten von den Untereinheiten RIa und RIIa auf - dies könnte Konsequenzen für die Regulation der verschiedenen Isoformen in der Zelle haben. Weiterhin scheinen C α und C β unterschiedliche Substrate zu bevorzugen. Während einige Substrate, wie z.B. CREB, unterschiedslos durch alle drei Isoformen phosphoryliert wurden, zeigte sich, dass das basische Myelinprotein und Histon H3 durch C β 1 und C β 2 deutlich geringer phosphoryliert werden als durch C α . Darüber hinaus konnte in Histonpräparationen eine inhibitorische Aktivität charakterisiert werden, die nur gegen CB1 und C β 2, nicht aber gegen C α gerichtet ist. Sie weist Eigenschaften eines Proteins auf. Die Entdeckung eines solchen isoformspezifischen Inhibitors könnte der Schlüssel zu einem neuen Verständnis der spezifischen Signalweiterleitung sein. Es bleibt weiteren Arbeiten vorbehalten, zu klären, wie diese Regulation im zellulären Kontext stattfindet und weitere beteiligte Komponenten zu identifizieren. Zusammen mit der isoformspezifischen inhibitorischen Aktivität weisen die beobachtete Substratselektivität und die potentiell frühere Aktivierbarkeit und Abschaltung von CB-Untereinheiten schon jetzt auf komplexe und vielfältige Möglichkeiten der Zelle hin, mit Hilfe der Cß Isoformen cAMP-Signale selektiv zu verarbeiten.

6 Literaturverzeichnis

- Amieux, P.S., Cummings, D.E., Motamed, K., Brandon, E.P., Wailes, L.A., Le, K., Idzerda, R.L. and McKnight, G.S. (1997): Compensatory regulation of RIalpha protein levels in protein kinase A mutant mice. J. Biol. Chem. 272, 3993-3998.
- Ashby, C.D. and Walsh, D.A. (1972): Characterization of the interaction of a protein inhibitor with adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases. J. Biol. Chem. 247, 6637-6642.
- Beebe, S., Oyen, O., Sandberg, M., Froysa, A., Hansson, V., and Jahnsen, T. (1990): Molecular cloning of a tissue-specific protein kinase (C γ) from human testis – representing a third isoform for the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Mol. Endocrinol.* **4**, 465-475.
- Bishop, J.M. (1987): The molecular genetics of cancer. Science 235, 305-311.
- Bossemeyer, D., Engh, R.A., Kinzel, V., Ponstingl, H. and Huber, R. (1993): Phosphotransferase and substrate binding mechanism of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit from porcine heart as deduced from the 2.0 Å structure of the complex with Mn²⁺ adenylyl imidodiphosphate and inhibitor peptide PKI(5-24). *EMBO J.* 12, 849-859.
- Bowie, J.U. and Sauer, E.T. (1989) Identification of C-terminal extensions that protect proteins from intracellular proteolysis. *J. Biol. Chem.* **264**, 7596-7602.
- **Bradford, M.M.** (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brickey, D.A., Colbran, R.J., Fong, Y.L. and Soderling, T.R. (1990): Expression and characterization of the alpha-subunit of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II using the baculovirus expression system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**, 578-584.
- Cabell C.H., Verghese G.M., Rankl N.B., Burns D.J. and Blackshear P.J. (1996): MARCKS phosphorylation by individual protein kinase C isozymes in insect Sf9 cells. *Proc. Assoc. Am. Physicians*.108: 37-46.
- Cadd, G., and McKnight, G.S. (1989): Distinct patterns of cAMP-dependent protein kinase gene expression in mouse brain. *Neuron* **3**, 71-79.

- Cadd, G., Uhler, M.D., and McKnight, G.S. (1990): Holoenzymes of cAMP-dependent protein kinase containing the neural form of type I regulatory subunit have an increased sensitivity to cyclic nucleotides. *J. Biol. Chem.* **265**, 19502-19506.
- Carr, S.A., Biemann, K., Shoji, S., Parmelee, S.C. and Titani, K. (1982): n-Tetradecanoyl is the NH₂-terminal blocking group of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase from bovine cardiac skeletal muscle *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6128-6131.
- Cauthon, R.D., Carter, K.B., Liauw, S., and Steinberg, R.A. (1998): Physiological phosphorylation of protein kinase A at Thr-197 is by a protein kinase A kinase. *Mol. Cell. Biol.* 18, 1416-1423.
- Cheley, S., Kosik, K.S., Paskevich, P., Bakalis, S., and Bayley, H. (1992): Phosphorylated baculovirus p10 is a heat-stable microtubule-associated protein associated with process formation in Sf9 cells. *J. Cell. Sci.* **102**, 739-752.
- Cheng, H.C., Kemp, B.E., Pearson, R.B., Smith, A.J., Misconi,L., Van Patten, S.M., and Walsh, D.A. (1986): A potent synthetic inhibitor of the cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 261, 989-992.
- Cheng, X., Phelps, C and Taylor, SS (2001): Differential binding of cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit isoforms Ialpha and IIbeta to the catalytic subunit. *J. Biol. Chem.* 276, 4102-4108.
- **Cheng, Y.C. and Prusoff, W.** (1973): Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50% inhibition of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **22**, 3099-3108.
- Cho-Chung, Y.S., Pepe, S., Clair, T., Budillon, A. and Nesterova, M. (1995) cAMP-dependent protein kinase: role in normal and malignant growth. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 21, 33-61.
- Clegg, C.H., Cadd, G.G., and McKnight, G.S. (1988): Genetic characterization of a brainspecific form of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **85**, 3703 – 3707.
- Clegg C.H., Ran W., Uhler M.D. and GS McKnight (1989): A mutation in the catalytic subunit of protein kinase A prevents myristylation but does not inhibit biological activity. J. Biol. Chem. 264, 20140-20146.
- Coghlan, V.M., Bergeson, S.E., Langeberg, L., Nilaver, G. and Scott, J.D. (1993): A-Kinase anchoring proteins – a key to selective activation of cAMP-responsive events. *Mol. Cell. Biochem.* **128**, 309-319.

- Cohen, S., Chang, A. and Leslie, H. (1972): Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 69 (8), 2110-2114.
- Daaka, Y., Luttrell, L.M. and Lefkowitz, R.J. (1997): Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature*, **390**, 88-91.
- Davies, S.P., Reddy, H., Caivano, M. and Cohen P. (2000): Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.* **351**, 95-105.
- DeManno, D.A., Cottom, J.E., Kline, M.P., Peters, C.A., Maizels, E.T., and Hunzicker-Dunn, M. (1999): Follicle-stimulating hormone promotes histone H3 phosphorylation on Serine-10. *Mol. Endocrinol.* 13, 91-105.
- **DeZazzo, J. and Tully, T.** (1995): Dissection of memory formation: from behavioral pharmacology to molecular genetics. *Trends Neurosci.* **18**, 212-218.
- Edwards, A.S. and Scott, J.D. (1999): A-kinase anchoring proteins: protein kinase A and beyond. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **12**, 217-221.
- Engh, R.A. and Bossemeyer, D. (2001): The protein kinase activity modulation sites: mechanisms for cellular regulation, targets for therapeutic intervention. *Advan. Enzyme Regul.* 41, 121-149.
- Erickson, A.K., Payne, D.M., Martino, P.A., Rossomando, A.J., Shabanowitz, J., Weber, M.J., Hunt, D.F., and Sturgill, T.W. (1990): Identification by mass spectrometry of threonine 97 in bovine myelin basic protein as a specific phosphorylation site for mitogenactivated protein kinase. J. Biol. Chem. 265, 19728-19735.
- Fantozzi, D.A., Harootunian, A.T., Wen, W., Taylor, S.S., Feramisco, J.R., Tsien, R.Y. and Meinkoth, J.L. (1994): Thermostable inhibitor of cAMP-dependent protein kinase enhances the rate of export of the kinase catalytic subunit from the nucleus. *J. Biol. Chem.* 269, 2676-2686.
- Faux, M.C. and Scott, J.D. (1996): Molecular glue kinase anchoring and scaffolding proteins. *Cell* 85, 9-12.
- Feil, R., Müller, S. and Hofmann, F. (1993): High-level expression of functional cGMPdependent protein-kinase using the baculovirus system. *FEBS letters* **336**, 163-167.
- Gamm, D.M., Baude, E.J., and Uhler, M.D. (1996): The major catalytic subunits of cAMPdependent protein kinase have distinct biochemical properties *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* (1996), **271**, 15736-15742.

- Gangal, M., Clifford, T., Deich, J., Cheng, X.D., Taylor, S.S. and Johnson, D.A. (1999): Mobilization of the A-kinase N-myristate through an isoform-specific intermolecular switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**, 12394-12399.
- Girod, A., Kinzel, V. and Bossemeyer, D. (1996) *In vivo* activation of recombinant PKA catalytic subunit active site mutants by coexpression of the wild-type enzyme, evidence for intermolecular cotranslational phosphorylation. *FEBS Lett.* **391**, 121-125.
- Glass, D.B., Cheng, H.-C., Mueller-Mende, L., Reed, J., and Walsh, D.A. (1989): Primary structural determinants essential for potent inhibition of cAMP-dependent protein kinase by inhibitory peptides corresponding to the active portion of the heat-stable inhibitor protein. J. Biol. Chem. 264, 8802-8810.
- Gonzalez, G.A. and Montminy, M.R. (1989): Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* **59**, 675-680.
- Gosse, M.E., Fleischmann, R., Marshall, M., Wang, N., Garges, S. and Gottesman, M.M. (1994) Bacterial expression of Chinese hamster regulatory type-I and catalytic subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase and mutational analysis of the type-I regulatory subunit. *Biochem. J.* 297, 79-85.
- Gottesman, M.M., LeCam, A., Bukowski, M. and Pastan, I. (1980) Isolation of multiple classes of mutants of CHO cells resistant to cyclic AMP. *Somatic Cell Genet.* 6, 45-61.
- Gottesman, S. (1989): Genetics of proteolysis in *Escherichia coli*. Annu. Rev. Genet. 23, 163-198.
- Granot, J., Mildvan, A.S., Hiyama, K., Kondo, H, and Kaiser, E.T. (1980): Magnetic resonance studies of the effect of the regulatory subunit on metal and substrate binding to the catalytic subunit of bovine heart protein kinase. *J. Biol. Chem.* **272**, 29560-29566.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M. and Hunter, T. (1988): The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241, 42-52.
- Harootunian, A.T., Adams, S.R., Wen, W., Meinkoth, J.L., Taylor, S.S., and Tsien, R.Y. (1993): Movement of the free catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase into and out of the nucleus can be explained by diffusion. *Mol. Cell. Biol.* 4, 993-1002.
- Hegde, A.N., Goldberg, A.L. and J.H. Schwartz (1993): Regulatory subunits of cAMPdependent protein kinases are degraded after conjugation to ubiquitin: a molecular mechanism underlying long-term synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 90, 7436-7440.

- Herberg, F.W. and Taylor, S.S. (1993): Physiological inhibitors of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase: effect of MgATP on protein-protein interactions. *Biochemistry* 32, 14015-14022.
- Herberg, F.W., Bell, S.M. and Taylor S.S. (1993): Expression of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in *Escherichia coli*: multiple isozymes reflect different phosphorylation states. *Protein Eng.* **6**, 771-777.
- Herberg, F.W. and Zimmermann, B. (1999): Analysis of protein kinase interactions using biomolecular interaction analysis. In: *Protein Phosphorylation, A Practical Approach* (Ed. D.G. Hardie), Oxford University Press.
- Herrera, R., Lebwohl, D., deHerreros, A.G., Kallen, R.G., and Rosen, O.M. (1988): Synthesis, purification, and characterizitation of the cytoplasmic domain of the human insulin receptor using a baculovirus expression system. *J. Biol. Chem.*, **263**, 5560-5568.
- Holmes, D.S. and Quigley, M. (1981): A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* 114(1),193-197.
- Hotz, A., König, N., Kretschmer, J., Maier, G., Ponstingl, H. and Kinzel, V. (1989): A sequence variant in the N-terminal region of the catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett.* **256**, 155-117.
- Howard, P., Day, K.H., Kim, K.E., Richardson, J., Thomas, J., Abraham, I., Fleischmann, R.D., Gottesmann, M.M. and Maurer, R.A. (1991): Decreased catalytic subunit mRNA levels and altered catalytic subunit mRNA structure in a cAMP-resistant chinese hamster ovary cell line. *J. Biol. Chem.* 266, 10189-10195.
- Howe, D.G., Wiley, J.C. and McKnight, G.S. (2002): Molecular and behavioral effects of a null mutation in all PKA Cβ-Isoforms. *Mol. Cell. Neurosci.* **20**, 515-524.
- Huang, Y.Y., Kandel, E.R., Varshavsky, L., Brandon, E.P., Qi, M., Idzerda, R.L., McKnight, G.S. and Bourtchouladze, R. (1995): A genetic test of the mutations of PKA on mossy fiber LTP and its relation to spatial and contextual learning. *Cell* 83, 1211-1222.
- Hunter, T. (1991): Protein kinase classification. Meth. Enzymol. 201, 3-37.
- Hunter, T. (1994): 1001 protein kinases redux towards 2000. Semin. Cell Biol. 5(6):367-376.
- **Hsie, A.W. and Puck. T.T** (1971):Morphological transformation of chinese hamster cells by dibutyryl adenosine cyclic 3':5'-monophosphate and testosterone.
- **Iyengar, R.** (1993): Multiple families of G_S-regulated adenylyl cyclases. *Adv. Sec. Messenger and Phosphoprotein Res.* **28**, 27-36.

- Jahnsen, T., Hedin, L., Kidd, V.J., Beattie, W.G., Lohmann, S.M., Walter, V., Durica, J., Schulz, T.Z., Schlitz, E., Browner, M., Lawrence, C.B., Goldman, D., Ratoosh, S.L., and Richards, J.S. (1986): Molecular cloning, cDNA structure, and regulation of the regulatory subunit of typeII cAMP-dependent protein kinase from rat ovarian granulosa cells. J. Biol. Chem. 261, 12352-12361.
- Jedrzejewski, P.T., Girod, A., Tholey, A. König, N., Thullner, S., Kinzel, V. and Bossemeyer, D. (1998): A conserved deamidation site at Asn 2 in the catalytic subunit of mammalian cAMP-dependent protein kinase detected by capillary LC-MS and tandem mass spectrometry. *Prot. Science* 7, 457-469.
- Johnson, L.N., Noble, M. and Owen, D.J. (1996): Active and inactive protein kinases structural basis for regulation. *Cell* **85**, 149-158.
- Kalderon, D. and Rubin, G.M. (1988): Isolation and characterization of Drosophila cAMPdependent protein kinase genes. *Genes Dev.* 2, 1539-1556.
- Kinzel, V., Hotz, A., König, N., Gagelmann, M., Pyerin, W., Reed, J., Kübler, D., Hofmann, F., Obst, C., Gernsheimer, H.P., Goldblatt, D. and Shaltiel, S. (1987): Chromatographic separation of two heterogeneous forms of the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase holoenzyme type I and type II from striated muscle of different mammalian species. *Arch. Biochem. Biophys.* 253, 341-349.
- Kishimoto, A., Nishiyama, K., Nakanishi, H., Uratsuji, Y., Nomura, H., Takeyama, Y., and Nishizuka, Y (1985): Studies on the phosphorylation of myelin basic protein by protein kinase C and adenosine 3':5'-monophosphate dependent protein kinase. J. Biol. Chem., 260,12492-12499.
- Knighton, D.R., Zheng, J., Ten Eyck, L.F., Ashford, V.A., Xuong, N.H., Taylor, S.S. and Sowadski, J.M. (1991): Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* 253, 414-420.
- Koken, M.H.M., Odijk,H.H.M., van Duin, M., Fornerod, M. and Hoeijmakers, J.H.J. (1993): Augmentation of protein production by a combination of the T7 RNA polymerase system and ubiquitin fusion. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **195**, 643-653.
- Krebs, E.G. and Beavo, J.A. (1979): Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. Annu. Rev. Biochem. 48: 923-959.
- Krebs, E.G., Graves, D.J., and Fischer, E. H. (1959) Factors affecting the activity of muscle phosphorylase b kinase. *J. Biol. Chem.* 234, 2867-2873.

- Kübler, D., Reinhardt, D, Reed, J., Pyerin, W., and Kinzel, V. (1992): Atrial natriuretic peptide is phosphorylated by intact cells through cAMP-dependent ecto-protein kinase. *Eur. J. Biochem.* 206, 179-186.
- Kübler, D., Gagelmann, M., Pyerin, W., and Kinzel, V. (1979): Separation of the catalytic subunits of cyclic AMP-dependent protein kinases from different mammalian tissues on the basis of charge difference of their subunits. *Hoppe-Seyler's Z Physiol. Chem* 360, 1421-1431.
- Krebs, E.G., and Beavo, J.A. (1979) Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **48**, 923-959.
- Krebs, E.G. and Fischer, E.H. (1956) The phosphorylase *b* to *a* converting enzyme of rabbit skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* **20**, 150-157.
- Lämmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lamb, N.J.C., Fernandez, A., Conti, M.A., Adelstein, R., Glass, D.B., Welch, W.J., and Feramisco, J.R. (1989): Modulation of vimentin containing intermediate filament distribution and phosphorylation in living fibroblasts by the cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **108**, 2409-2422.
- Lander E.S., Linton L.M., Birren B., Nusbaum C., Zody M.C., Baldwin J., Devon K.,
 Dewar K., Doyle M., FitzHugh W., Funke R., Gage D., Harris K., Heaford A.,
 Howland J., Kann L., Lehoczky J., LeVine R., McEwan P., McKernan K., et al.
 (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.
- Lanford, R.E. (1988) Expression of SV-40 T antigen in insect cells using a baculovirus expression vector. *Virology* 167, 72-81.
- Lanford, R.E., Luckow, V., Kennedy, R.C., Dreesman, G.R., Notvall, L., and Summers, M.D. (1989) Expression and characterization of Hepatitis B Virus surface antigen polypeptides in insect cells with a baculovirus expression system. J. Virology 63, 1549-1557.
- LeCam, A., Nicolas, J.-C., Singh, T.J., Cabral, F., Pastan, I., and Gottesman, M.M. (1981): Cyclic AMP dependent phosphorylation in intact cells and in cell-free extracts from Chinese Hamster Ovary cells. *J. Biol. Chem.* **256**, 933-941.
- Lee, D.C., Carmichael, D.F., Krebs, E.G., and McKnight, G.S. (1983): Isolation of a cDNA clone for the type I regulatory subunit of bovine cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **80**, 3608-3612.

- Lee, S.L., Gorman, K.B. and Steinberg, R.A. (1996): Methods for studying synthesis, turnover, and phosphorylation of catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in mammalian cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **116**, 233-241.
- Lindberg, R.A., Quinn, A.M. and Hunter, T. (1992): Dual-specificity protein kinases: will any hydroxyl do? *Trends Biochem. Sci.* 17(3): 114-119.
- Mandel, M. and Higa, R. (1970): Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. J. Mol. Biol. 53, 159-162.
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002): The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**, 1912-1934.
- McKnight, G.S., Clegg, C.H., Uhler, M.D., Chrivia, J.C., Cadd, G.G., Correll, L.A., and Otten. A.D. (1988): Analysis of the cAMP-dependent protein kinase system using molecular genetic approaches. *Rec. Progr. Horm. Res.* 44, 307-335.
- Mochly-Rosen, D. (1995): Localisation of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science* 268, 247-251.
- Moore, M.J., Kanter, J.R., Jones, K.C., and Taylor, S.S. (2002): Phosphorylation of the catalytic subunit of protein kinase A. Autophosphorylation versus phosphorylation by phosphoinositide-dependent-kinase-1. *J. Biol. Chem.* 277, 47878-47884.
- Murby, M., Cedergreen, L., Nilsson, J., Nygren, P.A., Hammarberg, B., Nilsson, B., Enfors, S.-O. and Uhlen, M. (1991): Stabilization of recombinant proteins from proteolytic degradation in *Escherichia coli* using a dual affinity fusion strategy. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 14, 336-346.
- Murtaugh, M.P., Steiner, A.L. and Davies, P.J. (1982): Localization of the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase in cultured cells using a specific antibody. *J. Cell. Biol.* **95**, 64-72.
- Myszka, D.G., He, X., Dembo, M., Morton, T.A. and Goldstein, B. (1998): Extending the range of rate constants available from BIACORE: interpreting mass transport-influenced binding data. *Biophys. J.* **75**, 583-94.
- Olsen, S.R. and Uhler, M.D. (1989): Affinity purification of the C alpha and C beta isoforms of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **264**, 18662-18666.
- **O'Reilly, D.R., Miller, L., and Luckow, V.A.** (1992): Baculovirus expression vectors: a laboratory manual, W.H. Freeman and Company, New York, NY

- Ørstavik, S., Reinton, N., Frengen, E., Langeland, B.T., Jahnsen, T. and Skalhegg, B.S. (2001): Identification of novel splice variants of the human catalytic subunit Cβ of cAMP-dependent protein kinase. *Eur. J. Biochem.* **268**, 5066-5073.
- Pawson, T. and Hunter, T. (1994): Signal transduction and growth control in normal and cancer cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**, 1-4.
- Pepperkok, R., Hotz-Wagenblatt, A., König, N., Girod, A, Bossemeyer, D. and Kinzel, V. (2000): Intracellular distribution of mammalian protein kinase A catalytic subunit altered by conserved Asn2 deamidation. J. Cell. Biol., 148, 715-725
- Pfeifer, A., Aszodi, A., Seidler, U., Ruth, P., Hofmann, F., and Fässler, R. (1996): Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II. *Science* 274, 2082-2086.
- **Picciolo, A.L.** (2001): Untersuchungen zur Kern-Cytoplasma-Translokation der katalytischen Untereinheit Cα der Proteinkinase A. Dissertation, Universität Bielefeld.
- Piwnica-Worms, H., Williams, N.G., Cheng, S.H. and Roberts, T.M. (1990): Regulation of pp60-src and its interaction with Polyomavirus Middle-T-antigen in insect cells. J. Virology 64, 61-68.
- Potter, R.L., Stafford, P.H. and Taylor, S.S. (1978): Regulatory sububit of cyclic AMPdependent protein kinase I from porcine skeletal muscle: purification and proteolysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 190, 174-180.
- Prorok M., Lawrence D.S. (1988): Cryopreservation of the cyclic 3',5'-adenosine monophosphate-dependent protein kinase from bovine cardiac muscle. J. Biochem. Biophys. Meth. 18, 167-176.
- Qi, M., Zhuo, M., Skalhegg, B.S. Brandon, E.P., Kandel, E.R., McKnight, G.S. and Idzerda, R.L. (1996): Impaired hippocampal plasticity in mice lacking the Cbeta1 catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93, 1571-1576.
- Rahn, T, Rönnestad, L, Leroy, M.-J., Wernstedt, C., Tornqvist, H., Manganiello, V.C.,
 Belfrage, P. and Degerman, E (1996): Identification of the site in cGMP-inhibited phosphodiesterase phosphorylated in adipocytes in response to insulin and isoproterenol. *J.Biol. Chem.* 271, 11575-11580.
- Rangel-Aldao, R. and Rosen, O.M. (1976): Dissociation and reassociation of phosphorylated and non-phosphorylated forms of cAMP-dependent protein kinase from bovine cardiac muscle. *J. Biol. Chem.* 252, 7140-7145.

- Reinton, N., Ørstavik, S., Haugen, T.B., Jahnsen, T., Tasken, K., and Skalhegg, B.S. (2000): A novel isoform of human cyclic 3',5'-adenosine monophosphate dependent protein kinase, Cα-s, localizes to sperm midpiece. *Biol. Reprod.* 63, 607-611.
- Rittenhouse, J., Moberly, L., O'Donnell, M.E., Owen, N.E., and Marcus, F. (1986): Phosphorylation of atrial natriuretic peptides by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 261, 7607-7610.
- Roskoski, R., Jr. (1983): Assays of protein kinase. Methods Enzymol. 99, 3-6.
- Rybalkin S.D. and Beavo, J.A. (1996): Multiplicity within cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Biochem Soc. Transact.* 24, 1005-1009.
- Saiki, R.K., Gelfand, S, Stoffel, S., Schare, S., Highuli, R., Horn, G., Mullis, K., and Erlich, H (1987): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Schein, C.H. and Noteborn, M.H.M. (1988): Formation of soluble recombinant protein in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperatures. *Biotechnology* **6**:291-294.
- Schmidt, T.G.M., Koepke, J., Frank, R. and Skerra, A. (1996): Molecular interaction between the *Strep*-tag affinity peptide and its cognate target streptavidin. *J. Mol. Biol.* 255, 753-766.
- Scott, J.D., Glaccum, M.B. Zoller, M.J., Uhler, M.D., Helfman, D.M., McKnight, G.S., and Krebs, E.G. (1987) The molecular cloning of a type II regulatory subunit of the cAMP-dependent protein kinase from rat skeletal muscle and mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 84, 5192-5196.
- Sette, C. and Conti, M. (1996): Phosphorylation and activation of a cAMP-specific phosphodiesterase by the cAMP-dependent protein kinase. Involvement of serine 54 in the enzyme activation. *J. Biol. Chem.* 271, 16526-16534.
- Shabb, J.B. (2001): Physiological substrates of cAMP-dependent protein kinase. *Chem. Rev.* 101, 2381-2411.
- Shen, S.-H. (1984): Multiple joined genes prevent product degradation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **81**, 4627-4631.
- Shoji, S., Titani, K., Demaille J.G. and Fischer, E.H. (1979): Sequence of two phosphorylated sites in the catalytic subunit of bovine cardiac muscle adenosine 3':5'- phosphate dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **254**, 6211-6214.

- Shoji, S., Parmelee, D.C., Wade, R.D., Kumar, S., Ericsson, L.H., Walsh, K.A., Neurath, H., Long, G.L., Demaille, J.G., Fischer, E.H. and Titani, K. (1981): Complete amino acid sequence of the catalytic subunit of bovine cardiac muscle cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 78, 848-851.
- Showers, M.O and Maurer, R.A. (1986): A cloned bovine cDNA encodes an alternate form of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 261, 16288-16291.
- Shuntoh, H., Sakamoto, N., Matsuyama, S., Saitoh, M. and Tanaka, C. (1992): molecular structure of the C β catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinaseand differential expression of C α and C β isoforms in rat tissues and cultured cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1131**, 175-180.
- Siow, Y.L., Chilcote, T.J., Benfenati, F., Greengard, P. and Thiel, G. (1992): Synapsin IIa: Expression in insect cells, purification and characterization. *Biochemistry* **31**, 4268-4275.
- Skerra, A. (1994): Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* **151**, 131-135.
- Slice, L.W. and Taylor, S.S. (1989) Expression of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 264, 20940-20946.
- Steinberg, R.A., Cauthron, R.D., Symcox, M.M. and Shuntoh, H. (1993): Autoactivation of catalytic (C alpha) subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase by phosphorylation of threonine 197. *Mol Cell. Biol.* **13**, 2332-2341.
- Stenberg, E., Persson, B., Roos, H, and Urbaniczky, C. (1991): Quantitative determination of surface concentration of proteins with surface plasmon resonance by using radiolabeled proteins. J. Colloid Interface Sci. 143, 513-526.
- Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986): Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., and Dubendorff, J.W. (1990): Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**, 60-89.
- Sutherland, E.W. (1971): On the biological role of cyclic AMP. In: Cyclic AMP (Ed.: Robison. G.A., Butcher, W., Sutherland, E.W.) Academic press, New York, London. Chapter 1.
- Sutherland, E.W. and T.W. Rall (1957): The properties of adenine ribonucleotide produced with cellular particles, ATP, Mg⁺⁺, and epinephrine or glucagon. *J. Am. Chem. Soc.* **79**: 3608.

- Tasken, K.A., Knutsen, H.K., Attramadal, H., Tasken, K., Jahnsen, T., Hansson, V. and Eskild, W. (1991): Different mechanisms are involved in cAMP-mediated induction of mRNAs for subunits of cAMP-dependent protein kinases. *Mol. Endocrinol.* 5, 21-28.
- Tasken, K., Skalhegg, B.S., Solberg, R., Andersson, K.B., Taylor, S.S., Lea, T., Blomhoff, H.K., Jahnsen, T. and Hansson, V. (1993): Novel isozymes of cAMP-dependent protein kinase exist in human cells due to formation of RI alpha-RI beta heterodimeric complexes. *J. Biol. Chem.* 268, 21276-21283.
- Tasken, K., Skalhegg, B.S., Tasken, K.A., Solberg, R., Knutsen, H.K., Levy, F.O., Sandberg, M, Orstavik, S., Larsen, T., Johansen, A.K., Vang, T., Schrader, H.P., Reinton, N.T., Torgersen, K.M., Hansson, V. and Jahnsen, T. (1997): Structure, function, and regulation of human cAMP-dependent protein kinases. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* 31, 191-204.
- Thomis, D.C., Floyd-Smith, G. and Samuel, C.E. (1992): Mechanism of interferon action. cDNA structure and regulation of a novel splice-site variant of the catalytic subunit of human protein kinase A from interferon-treated human cells. J. Biol. Chem. 267, 10723-10728.
- **Thullner, S.** (1997): Charakterisierung von C β 2 einer katalytischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase. Dissertation, Universität Heidelberg.
- **Thullner, S., Gesellchen, F., Wiemann, S., Pyerin, W., Kinzel, V., and Bossemeyer, D.** (2000) The protein kinase A catalytic subunit Cβ2: molecular characterization and distribution of the splice variant. *Biochem. J.* **351**, 123-132.
- Titani, K., Sasagawa T., Ericsson, L.H., Kumar, S., Smith, S.B., Krebs, E.G. and Walsh,
 D.A. (1984): Amino acid sequence of the regulatory subunit of bovine type I adenosine cyclic 3'-5'-phosphate dependent protein kinase. *Biochemistry* 23, 4193-4199.
- Toner-Webb, J., VanPatten, S.M., Walsh, D.A. and Taylor, S.S. (1992) Autophosphorylation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 262, 15202-15207.
- Tung, C.-S., Walsh, D.A. and Trewhella, J. (2001): A structural model of the catalytic subunit-regulatory subunit dimeric complex of the cAMP-dependent protein kinase. J. Biol. Chem. 277, 12432-12431.
- Uhler, M.D., Carmichael, D.F., Lee, D.C., Chrivia, J.C., Krebs, E.G. and McKnight, G.S. (1986): Isolation of cDNA clones for the catalytic subunit of mouse cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A* 83, 1300-1304.

Literaturverzeichnis

- Uhler, M.D., Chrivia, J.C. and McKnight, G.S. (1986b): Evidence for a second isoform of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. J. Biol. Chem. 261, 15360-15363 [published erratum appears in J. Biol. Chem. 1987; 262, 5431].
- Uhler, M.D. and McKnight, G.S. (1987): Expression of cDNAs for two isoforms of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 262, 15202-15207.
- Vaughn, J.L., Goodwin, R.H., Tompkins, G.J. and McCawley, P. (1977): The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *In vitro* 13, 213-217.
- Veron, M., Radzio-Andzelm, E., Tsigelny, I., Ten Eyck, L.F., and Taylor, S.S. (1993): A conserved helix motifcomplements the protein kinase core. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 90, 10618-10622
- Vogelstein, B. and Gillespie, D. (1979): Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 615–619.
- **Voss, S. and Skerra, A.** (1997) Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the *Strep*-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng.* **10**, 975-982.
- Walsh, D.A., Angelos, K.A., VanPatten, S.M., Glass, D.B., and Garetto, L.P. (1990): The inhibitor protein of the cAMP-dependent protein kinase. In *Peptides and Protein Phosphorylation*. Ed. B.E. Kemp, CRC Press, Inc., Boca Raton: 43-84.
- Walsh, D.A., Perkins, J.P. and Krebs, E.G. (1968): An adenosine 3',5'-mono-phosphatedependent protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 243, 3763-3765
- Waring P., Khan, T., and Sjaarda, A. (1997): Apoptosis induced by gliotoxin is preceded by phosphorylation of histone H3 and enhanced sensitivity of chromatin to nuclease digestion. *J. Biol. Chem.* **272**, 17929-17936.
- Weissinger, E.M., Eissner, G., Grammer, C., Fackler, S., Haefner, B., Yoon, L.S., Lu, K.S., Bazarov, A, Sedivy, J.M., Mischak, H. and Kolch, W. (1997): Inhibition of the Raf-1 kinase by cyclic AMP agonists causes apoptosis of v-abl-transformes cells. *Mol. Cell. Biol.* 17, 3229-3241.
- Wen, W., Meinkoth, J.L., Tsien, R.Y., and Taylor, S.S. (1995a): Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* 82, 463-473.
- Wen, W., Taylor, S.S. and Meinkoth, J.L. (1995b): The expression and intracellular distribution of the heat-stable protein kinase inhibitor is cell cycle regulated. *J. Biol. Chem.* 270, 2041-2046.

- Wiemann, S., Kinzel, V. and Pyerin, W. (1991): Isoform Cβ2, an unusual form of the bovine catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem* **266**, 5140-5146.
- Wiemann, S., Kinzel, V. and Pyerin, W. (1992): Cloning of the C alpha catalytic subunit of the bovine cAMP-dependent protein kinase. *Biochim. Biophys. Acta* **1131**, 93-96.
- Wiemann, S., Steuer, B., Alonso, A., Kinzel, V. and Pyerin, W. (1996): Promoter of the gene encoding the bovine catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase isoform C beta 2. *Biochim. Biophys. Acta* 1309, 211-220.
- Yonemoto, W.M., McGlone, M.L. and Taylor, S.S. (1993a): N-myristylation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase conveys structural stability. *J. Biol. Chem.* 268, 2348-2352.
- Yonemoto, W.M., McGlone, M.L., Grant, B. and Taylor, S.S. (1997): Autophosphorylation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in Escherichia coli. *Protein Eng.* 10, 915-925.
- Zhao, J., Hoye, E., Boylan, S., Walsh, D.A. and Trewhella, J. (1998): Quaternary structures of a catalytic subunit regulatory subunit dimeric complex and the holoenzyme of the cAMP-dependent protein kinase by neutron contrast variation. *J. Biol. Chem.* 273, 30448-30459.
- Zhang, S., Zubay, G. and Goldman, E. (1991): Low-usage codons in *Escherichia coli*, yeast, fruit fly and primates. *Gene*, **105**, 61-72.
- Zheng, J., Knighton, D.R., Ten Eyck, L.F., Karlsson, R., Xuong, N., Taylor, S.S. and Sowadski, J.M. (1993): Crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with MgATP and peptide inhibitor. *Biochemistry* 32, 2154-2161.
- Zimmermann, B., Chiorini, J.A., Ma, Y., Kotin, R.M. and F.W. Herberg (1999): PrKX is a novel catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase regulated by the regulatory subunit type I. *J. Biol. Chem.* **274**: 5370-5378.
- **Zimmermann, B.** (1999) Struktur, Funktion und Regulation von cAMP-abhängigen Proteinkinasen, GCA Verlag, Herdecke.

7 Anhang

7.1 Plasmidkarten



Abbildung A 1: Plasmidkarten der in dieser Arbeit hergestellten Konstrukte

Dargestellt sind die prokaryotischen Expressionsplasmide pET28b-C β 2 (**A**), pET28b-C β 1 (**B**), pASK-IBA6-C β 2 (**C**), sowie das Baculo-Transferplasmid pBlueBac4.5-C β 2 (**D**). Das Konstrukt pASK-IBA7-C β 2 ist bis auf die OmpA-Signalsequenz mit pASK-IBA6-C β 2 identisch. 5'lacZ: 5' Fragment des lacZ-gens, bla: β -lactamase (Ampicillin-Resistenz), Cb1/2: C β 1- bzw. C β 2-Gen ColE1: ColE1 Replikationsursprung Kan: Kanamycin-Resistenzgen, lacI: lac Repressor, OmpA: bakterielle OmpA Signalsequenz, ORF1629: AcNPV ORF1629, Pph: Polyhedrin Promoter, SV40pA: SV40 Polyadenylierungssequenz. Schnittstellen für gängige Restriktionsenzyme sind angegeben.

7.2 Sequenzvergleich zwischen C α , C β 1 und C β 2

Cα	MGNAAAAKKGSEQE	14
Cβ1	MGNAATAKKGSEVE	14
Cβ2	MAAYREVPCNQYTGTTALQKLEGFASRLFHRHSKGTAHDQKTALENDSLHFSEHTALWDR	60
		•
Сα	SVKEFLAKAKEDFLKKWENPA <u>QNTAHLDQFERI</u> KTLGTGSFGRVMLVKHMETGNHYAMKI	74
Cβ1	SVKEFLAKAKEDFLKKWENPA <u>PNNAGLEDFERK</u> KTLGTGSFGRVMLVKHKATEQYYAMKI	74
CB2	SMKEFLAKAKEDFLKKWENPAPNNAGLEDFERKKTLGTGSFGRVMLVKHKATEQYYAMKI	120
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Сα	LDKQKVVKLKQIEHTLNEKRILQAVNFPFLVKLEFSFKDNSNLYMVMEYVPGGEMFSHLR	134
Cβ1	LDKQKVVKLKQIEHTLNEKRILQAVNFPFLVRLEYAFKDNSNLYMVMEYVPGGEMFSHLR	134
CB2	LDKQKVVKLKQIEHTLNEKRILQAVNFPFLVRLEYAFKDNSNLYMVMEYVPGGEMFSHLR	180

Сα	RIGRFSEPHARFYAAQIVLTFEYLHSLDLIYRDLKPENLLIDQQGYIQVTDFGFAKRVKG	194
Cβ1	RIGRFSEPHARFYAAQIVLTFEYLHSLDLIYRDLKPENLLIDHQGYIQVTDFGFAKRVKG	194
CB2	RIGRFSEPHARFYAAQIVLTFEYLHSLDLIYRDLKPENLLIDHQGYIQVTDFGFAKRVKG	240

Сα	RTWTLCGTPEYLAPEIILSKGYNKAVDWWALGVLIYEMAAGYPPFFADQPIQIYEKIVSG	254
Cβ1	RTWTLCGTPEYLAPEIILSKGYNKAVDWWALGVLIYEMAAGYPPFFADQPIQIYEKIVSG	254
CB2	RTWTLCGTPEYLAPEIILSKGYNKAVDWWALGVLIYEMAAGYPPFFADQPIQIYEKIVSG	300

Сα	KVRFPSHFSSDLKDLLRNLLQVDLTKRFGNLKNGVNDIKNHKWFATTDWIAIYQRKVEAP	314
Cβ1	${\tt KVRFPShFSSDLKDLLRNLLQVDLTKRFGNLKNGVSDIKTHKWFATTDWIAIYQRKVEAP$	314
CB2	KVRFPSHFSSDLKDLLRNLLQVDLTKRFGNLKNGVSDIKTHKWFATTDWIAIYQRKVEAP	360

Сα	FIPKFKGPGDTSNFDDY <u>EEEEIRVSINEKCGKEFSEF</u> 351	
Cβ1	FIPKFRGSGDTSNFDDY <u>EEEDIRVSITEKCGKEFCEF</u> 351	
CB2	FIPKFRGSGDTSNFDDYEEEDIRVSITEKCGKEFCEF 397	

Abbildung A 2: Alignment der Aminosäuresequenzen von Ca, C_β1 und C_β2

Das Alignment wurde mit der Software *ClustalW* erstellt. Ein Punkt unter einer Aminosäure zeigt Sequenzidentität in zwei der drei Sequenzen an, ein Doppelpunkt zeigt einen konservierten Aminosäureaustausch an, ein Stern steht für Identität in allen drei Sequenzen. Sequenzbereiche, die von den in dieser Arbeit verwendeten Antikörpern erkannt werden, sind unterstrichen.

7.3 Abkürzungsverzeichnis:

AA/Bis	Acrylamid/N,N'-methylenbisacrylamid
Ac	Acetat
AcNPV	Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus
AHT	Anhydrotetracyclin
Amp	Ampicillin
AKAP	A-Kinase Ankerprotein
AS	Aminosäure(rest)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
C-Untereinheit	katalytische Untereinheit
СНО	Chinese Hamster Ovary (Zellinie)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
h	Stunde
IC ₅₀	50% inhibitorische Konzentration
IPTG	Isopropylthiogalactosid
k _a	Assoziationsgeschwindigkeitskonstante
Kan	Kanamycin
kB	Kilo-Basenpaare
k _d	Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante
K _D	Gleichgewichtsbindungskonstante
K _i	inhibitorische Konstante
K _M	Michaelis-Konstante

LB-Medium	Luria-Bertani Medium
LDS	Lithiumdodecylsulfat
min	Minute
MOI	Multiplicity of infection
NHS	N-Hydroxysuccinimid
p.i.	nach Infektion
pI	isoelektrischer Punkt
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol
РКА	Proteinkinase A, cAMP-abhängige Proteinkinase
РКІ	hitzestabiler Proteinkinase-Inhibitor
PKI(5-24)	PKI-Peptid (Aminosäuren 5-24)
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	messenger (=Boten) RNA
RP-HPLC	Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography
	(Umkehrphasen Hochleistungs-Flüssigchromatographie)
R-Untereinheit	regulatorische Untereinheit
S	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SPR	Surface Plasmon Resonance (=Oberflächenplasmonresonanz)
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen